

Untersuchungen zur immunsuppressiven Wirkung monoklonaler Antikörper im Mausmodell

R. Schuh

Disbui. München

.987



**Untersuchungen
zur immunsuppressiven Wirkung
monoklonaler Antikörper
im Mausmodell**

Dissertation

an der Fakultät für Biologie
der Ludwig Maximilian Universität München

durchgeführt am Institut für Immunologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
Leitung: Prof. Dr. S. Thierfelder

vorgelegt von

Rolf Schuh
aus München

März 1987

Tag der mündlichen Prüfung: 15.7.87

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. S. Thierfelder

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung.....	1
II.	Material und Methoden.....	11
II.1.	Allgemeines.....	11
II.1.1.	Versuchstiere.....	11
a)	Maus Inzuchtstämme.....	11
b)	Ratten Inzuchtstamm.....	12
II.1.2.	Zelllinien.....	12
a)	Myelomlinien.....	12
b)	Hybridomlinien.....	13
II.1.3.	Antikörper.....	13
a)	polyklonale Seren.....	13
b)	monoklonale Antikörper.....	15
II.1.4.	Einzelzellpräparationen.....	16
a)	lymphatische Organe.....	16
b)	Knochenmark.....	17
c)	menschliche periphere mononukleäre Zellen..	17
II.2.	Herstellung und Produktion monoklonaler Antikörper.....	18
II.2.1.	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	18
II.2.2.	Wachstumsmedium.....	19
II.2.3.	Makrophagenpräparation.....	20
II.2.4.	Flaschenkultivierung.....	22
II.2.5.	Reklonierung.....	23
II.2.6.	Kryokonservierung.....	24
II.2.7.	Massenproduktion monoklonaler Antikörper.....	25
a)	Kulturüberstand.....	25
b)	Ascites.....	25
II.2.8.	Immunisierung.....	27
II.2.9.	Fusion.....	28

II.3.	In vivo Versuche.....	31
II.3.1.	Knochenmarktransplantation.....	31
II.3.2.	Hauttransplantation.....	32
II.3.3.	Opsonisierungstest.....	33
II.4.	In vitro Untersuchungen.....	35
II.4.1.	Reinigung monoklonaler Antikörper.....	35
II.4.2.	Clq-Präparation.....	39
II.4.3.	Tritiummarkierung von Proteinen.....	41
II.4.4.	Radioimmunoassay (RIA).....	44
	a) direkter Bindungstest.....	45
	b) Inhibitionstest.....	46
	c) indirekter Bindungstest.....	47
	d) Clq-Bindungstest.....	48
II.4.5.	Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC).....	49
II.5.	Mathematische Modelle.....	51
II.5.1.	Scatchard-Plot.....	51
II.5.2.	Abstandsberechnungen auf der Zelloberfläche...	52
III.	Ergebnisse.....	54
III.1.	Eigenschaften der bekannten immunsuppressiven Antikörper.....	54
III.1.1.	Bindungsspezifität.....	54
III.1.2.	Avidität.....	54
III.1.3.	Clq-Bindung.....	56
III.2.	Charakterisierung der etablierten Antikörper..	58
III.2.1.	Bestimmung der Spezifität.....	58
III.2.2.	Isotypisierung.....	60

III.3.	Clq-Bindungstest.....	63
III.3.1.	Inkubationsbedingungen.....	63
III.3.2.	Tritium-Markierung von Clq.....	65
III.3.3.	Spezifität des Testsystems.....	67
III.4.	Qualitative und quantitative Aspekte der Clq-Bindung.....	69
III.4.1.	Subklassenabhängigkeit der Clq-Bindung.....	69
III.4.2.	Clq-Bindung durch poly- und monoklonale Antikörper.....	70
III.4.3.	Clq-Bindung und Antigendichte.....	75
	a) Expression der Theta-Allotypen.....	75
	b) Clq/IgG-Verhältnis.....	77
	c) Clq-Bindung an Antikörper unterschiedlicher Spezifität.....	79
	d) Addition der Clq-Bindung.....	80
III.5.	Korrelation zwischen immunsuppressiver Wirkung und Clq-Bindung	81
III.5.1.	Vergleich zwischen monoklonalen Antikörpern...81	
	a) Einfluß der Subklasse.....	81
	b) Einfluß der Antigendichte.....	82
	c) Einfluß der Antikörperspezifität.....	84
III.5.2.	Vergleich zwischen poly- und monoklonalen Antikörpern.....	86
III.6.	Zell-vermittelte Zytotoxizität in vitro.....	88
III.7.	Antikörper-abhängige T-Zellelimination in vivo	92
IV.	Diskussion.....	96
V.	Ausblick.....	112
VI.	Zusammenfassung.....	114
VII.	Literaturverzeichnis.....	116



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0095

ABKÜRZUNGEN

ADCC	Antikörper-abhängige, Zell-vermittelte Zytotoxizität
ALG	anti-Lymphozyten-Globulin
ATG	anti-Thymozyten-Globulin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Komplement-Komponente, z.B.
C1q	größte Untereinheit des C1-Proteins, der ersten Komponente der klassischen Komplementkaskade
Ci	Curie
CoVF	Cobra Venom Faktor
cpm	counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
FKS	fötales Kälberserum
GvH	Graft-versus-Host
H-2	murines MHC-Molekül
HCM	hybridoma complete medium (Wachstumsmedium)
HLA	humanes MHC-Molekül
HvG	Host-versus-Graft
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K-(Ig)	Kaninchen-(Immunglobulin)
LMQ	Leber/Milz-Quotient
Lyt-1	Antigene auf murinen T-Zellen
Lyt-2	
L3/T4	
M-(Ig)	Maus-(Immunglobulin)
MHC	Haupttransplantationsantigene
MNS	Mausnormalserum
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Ca^{2+} -und Mg^{2+} -frei (L182-10; Seromed, Berlin)
R-(Ig)	Ratten-(Immunglobulin)
RIA	Radioimmunoassay
Thy-1	Theta-Antigen
VBS	Veronal-gepufferte Kochsalzlösung (pH 7,3, 5mM Barbitol-HCL, 0,15M NaCl, 0,3mM CaCl_2 , 2mM MgCl_2)

I. Einleitung

Viele Erkrankungen des blutbildenden Systems haben trotz intensiver medikamentöser Behandlung eine infauste Prognose; dazu gehören Leukämien, primäre Immundefizienzen, Anämien und andere genetische Defekte (Parkman, 1984).

Entsprechend der Indikation, z.B. für eine Herz- oder Nierenverpflanzung, lag es nahe, bei diesen haemato-poetischen Erkrankungen das entsprechende "Organ", das Knochenmark als Ort der Blutbildung, zu transplantieren. Diese mechanistische Auffassung stieß jedoch medizinisch bald auf Grenzen. Das Knochenmark ist, anders als beispielsweise Niere oder Herz, kein distinktes Organ, sondern eine blutähnliche Flüssigkeit, die der Internist anteilig aus dem Beckenkamm des Spenders durch Aspiration entnimmt und in die Vene des Empfängers transfundiert. Von hier aus finden die transplantierten Stammzellen ihren Weg in das Empfängermark und können dieses besiedeln. Der leichten Handhabung bei der Übertragung des neuen Organs stehen, besonders bei Leukämien, immense Probleme bei der Entfernung des erkrankten gegenüber; dies aber ist besonders wichtig, da die entarteten Blutzellen des Empfängers laufend nachgebildet und die verhältnismäßig geringe Zahl der transplantierten Stammzellen überwuchern würden.

Als notwendige Konditionierung für eine Knochenmarkstransplantation hat sich eine letale Ganzkörperbestrahlung mit Gammastrahlen erwiesen. Dabei gehen annähernd alle teilungsaktiven Zellen, wie die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, zugrunde. Daneben werden aber auch andere regenerative Wechselgewebe, z.B. Epithelien des Magen-Darm-Traktes und Haarwurzelzellen, in Mitleiden-schaft gezogen. Die mit dieser Therapie verbundenen

Belastungen für den Gesamtorganismus sollen hier nicht weiter diskutiert werden; immerhin muß die Gammadosis so gewählt werden, daß aufgrund ihrer statistischen Wirkung noch eine ausreichende Zahl dieser strahlensensiblen Zellen überlebt, um auf Dauer wieder ein funktionsfähiges Gewebe zu regenerieren - der Patient allerdings würde vorher, z.B. an Infektionen, sterben; man bezeichnet das als Primär- oder Strahlenkrankheit. Die durch die Bestrahlung entstehende Situation bietet den transplantierten, teilungsfähigen Spenderzellen die Möglichkeit, den Knochenmarkraum des Empfängers zu repopulieren.

Daneben treten in der Praxis weitreichenden immunologischen Komplikationen auf. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen einer Reaktion des Wirtes gegen die Organspende (host-versus graft Reaktion; HvG), was bei Herz- und Nierentransplantationen eines der Hauptprobleme darstellt, und einer Reaktion der Organspende gegen den Wirt (graft-versus-host Reaktion; GvH); man spricht hier von der sogenannten Sekundärkrankheit. Bei der Knochenmarktransplantation muß man prinzipiell mit beiden Phänomenen rechnen. Die GvH wird ausgelöst durch immunkompetente Zellen des Spenders, die bei der Transplantation mit übertragen werden, während die HvG auf eine Reaktion von Resten des empfangereigenen Immunsystems zurückzuführen ist, die die Bestrahlung überlebt haben.

Der Verlauf einer Abstoßungsreaktion ist von der Gewebeverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger abhängig. Diese wird hauptsächlich durch die vom MHC-Komplex kodierten Transplantationsantigene bestimmt. Heutzutage stehen zwar unterschiedliche Testsysteme zur Untersuchung der Gewebeverträglichkeit zur Verfügung (HLA-Typisierung; mixed lymphocyte reaction), die routinemäßig durchgeführt werden, um die beste Spender/Empfänger-Kombination zu ermitteln. Dennoch kann eine spätere Abstoßung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da es neben den HLA-Antigenen noch eine Vielzahl

nicht näher definierter, sogenannter Minorantigene gibt, die einen entscheidenden Beitrag zum Auftreten und zur Entwicklung einer Immunreaktion leisten können.

Die ideale Konstellation einer syngenesischen Transplantation zwischen eineiigen Zwillingen ist selten gegeben. HLA-identische, MLC-negative Kombinationen zwischen Geschwistern bzw. zwischen Nichtverwandten führen bei 75% der Transplantationen zu einer GvH mit immerhin 25% Todesfällen (Reinherz et al., 1982). Haploidentische (Eltern->Kind) oder gar histoinkompatible Knochenmarktransplantationen sind nur in Ausnahmefällen angezeigt, da sie trotz intensiver immunsuppressiver Behandlung zu einer meist tödlich verlaufenden GvH führen. Die gewebedifferente Transplantation jedoch bleibt das medizinisch erstrebenswerte Ziel, da es wegen des großen Polymorphismus bei den Transplantationsantigenen sehr schwer ist, einen gewebeverträglichen Spender zu finden: die Wahrscheinlichkeit liegt bei Nichtverwandten je nach HLA-Typ zwischen 1 zu 5.000 und 1 zu 1.000.000. Auch innerhalb unserer modernen (Klein)familie hat z.B. in Bayern nur jeder fünfte Patient einen HLA-identischen Geschwister.

Zum Anwachsen des Knochenmarks, dem sogenannten "Take" kommt es bei einem ausgewogenen Verhältnis zwischen Bestrahlungsdosis, Gewebeverträglichkeit und Anzahl an transplantierten Zellen. Dies wurde experimentell für große Lebewesen bei Hunden bestimmt (Kolb et al., 1979). Das Ergebnis einer erfolgreichen Knochenmarktransplantation ist eine stabile Chimäre, was 1956 von Ford et al. im Mausmodell bestätigt worden ist. Dabei stellt man sich vor, daß die aus dem Spenderknochenmark nachproduzierten, immunkompetenten Zellen den normalen Reifungsprozess durchlaufen, was man an einer Repopulierung des Thymus zu erkennen glaubt (Goldschneider et al., 1986). Hier werden Zellklone, die mit körpereigenen Determinanten reagieren, entsprechend der normalen onto-



genetischen Entwicklung entweder ausgemerzt oder durch spezifische Suppressorzellen unterdrückt. Eine solche Chimäre ist gekennzeichnet durch eine Toleranz gegenüber Spendergewebe, nicht jedoch gegen Gewebe von Dritt-Spendern. Dies wurde mit Hauttransplantationen im Mausmodell bewiesen (Mathé, 1968) und wird häufig ausgenutzt, um die wiedergewonnene immunologische Kompetenz eines transplantierten Tieres zu untersuchen (Cobbold et al., 1986).

Um jedoch einen solchen stabilen Zustand zu erreichen muß man - vor allem für die Anfangsphase - eine immunsuppressive Therapie definieren, die die GvH aber auch die HvG gezielt unterdrücken kann. Herkömmliche, relativ breit wirkende Medikamente, z.B. Steroide, führen aber bei systemischer Verabreichung in pharmakologischen Dosen zu unerwünschten Nebenwirkungen. Daher beschritt man schon frühzeitig den Weg, die für die Abstoßungsreaktion verantwortlichen Zellen selektiv zu manipulieren.

Experimentelle Studien zu dieser Thematik werden seit Lorenz et al. (1951) hauptsächlich an Mäusen durchgeführt, die neben ihrer generellen Eignung als Labortiere auch in Form von genetisch definierten Inzuchtstämmen zur Verfügung stehen; somit können alle möglichen major und minor Gewebedifferenzen reproduzierbar untersucht werden.

Voraussetzung einer gezielten immunsuppressiven Therapie ist die Kenntnis der Zellpopulation, die die Abstoßungsreaktion vermittelt. Folgender Versuch hat hier die essentielle Bedeutung von T-Zellen direkt bewiesen: aus getöteten Mäusen entnommenes Knochenmark führt bei Transplantation auf einen allogenen Empfänger zu einer langsam einsetzenden und mild verlaufenden GvH, der sog. chronischen Mortalität. Fügt man dem Transplantat definiert reife T-Zellen zu, sterben die Tiere innerhalb von drei Wochen an akuter GvH; hierfür reichen bereits 0,3% T-Zellen aus (Korngold & Sprent, 1978). Dieser Zeit-

raum ist charakteristisch für die Transplantation eines inkompatiblen Knochenmarks beim Menschen (van Bekkum & de Vries, 1986). Dabei sind die Unterschiede zwischen einer Knochenmarkpräparation der Maus bzw. des Menschen in der unterschiedlichen Kontamination mit reifen T-Lymphozyten zu sehen. Dies kann auf eine unterschiedliche Entnahmetechnik und/oder auf eine speziesspezifisch unterschiedliche Zusammensetzung des Knochenmarks mit reifen T-Zellen zurückzuführen sein. Daher fügt man zu experimentellen Studien der GvH bei der Maus der Knochenmarkpräparation eine definierte Anzahl an reifen T-Zellen z.B. aus der Milz zu.

Viele Arbeiten befaßten sich mit der Frage, ob innerhalb der T-Zellen eine definierbare Subpopulation für die GvH bzw. die HvG verantwortlich ist (O'Kunewick, 1986). Für ein maximal histoinkompatibles Maussystem, das wir als Modellfall für eine nicht ingezüchtete Spezies, z.B. den Mensch untersuchen, deuten jedoch die Daten darauf hin, daß die Summe aller reifen, immunkompetenten T-Zellen eliminiert werden muß, um die Abstoßungsreaktionen wirkungsvoll zu unterdrücken (Cobbold et al. 1985).

Spezifische Reagenzien gegen T-Zellen stellen Antikörperpräparationen dar. Dabei zeigen polyklonale, xenogene anti-Lymphozyten- bzw. anti-Thymozyten-Seren oder deren gereinigte Ig-Fraktion (ALG bzw. ATG) gute Wirkung bei der Organtransplantation im Tiermodell (Lance et al., 1973). Entsprechend finden sie weite Verbreitung nach Herz- (Hunt & Stinson, 1981) bzw. Nierentransplantation (Groth, 1981) beim Menschen.

Prinzipiell ist der Einsatz von Antikörpern bei der Knochenmarktransplantation möglich als (i) Spender- bzw. (ii) Empfängerkonditionierung sowie (iii) zur in vitro Behandlung der zu transplantierenden Zellsuspension.

Bei der Antikörper-Inkubation mit heterologem Komplement in vitro und der Empfängerbehandlung stören die stammzelltoxischen Anteile der polyklonalen Antikörperpräparation (Mookerjee et. al., 1974), die vorher durch aufwendige Absorptionsschritte an nicht-T-Zellen und entsprechende Verdünnungen minimiert werden müssen; so gereinigtes ATG führt bei Mäusen zu einer vollständigen Unterdrückung der GvH (Rodt et al., 1974). Aufgrund der schlechten Standardisierbarkeit bei der Herstellung ist der Einsatz beim Menschen jedoch schlecht dokumentiert und nicht aussichtsreich (Heyworth, 1982).

Diese Probleme treten bei der Spendervorbehandlung nicht auf, da Antikörper aus dem Blut, ähnlich der Blut-Liquor-Schranke, nicht in das Knochenmark unkonditionierter Tiere einwandern können. Im Mausmodell ist diese Therapie erfolgreich durchgeführt worden (Ledney & van Bekkum, 1969), verbietet sich aber aus ethischen Gründen beim Menschen.

Die Situation änderte sich mit der Entwicklung einer Technologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper durch Köhler & Milstein (1975). Nun war es möglich, Antikörper der gewünschten Spezifität in praktisch unbeschränkter Menge bei gleichbleibender Qualität herzustellen. Ihr Einsatz bei der immunsuppressiven Therapie war hauptsächlich abhängig von der Wahl des Antigens, das ein definiertes, auf die gewünschte Zielzellpopulation beschränktes Verteilungsmuster aufweisen sollte.

Dafür bot sich im Mausmodell zunächst das Theta-Antigen (Thy-1) an, das Reif & Allen 1964 als ersten T-Zell-Differenzierungsmarker entdeckten und auf Thymozyten und peripheren T-Lymphozyten, aber auch auf Fibroblasten, Epithelzellen sowie auf Neuronen nachweisen konnten. Die Autoren beschrieben 1966 das Vorkommen zweier Allotypen (Thy-1.1 und Thy-1.2), die sich nur in einer Aminosäure unterscheiden (Cotmore et al., 1981). Das Theta-Antigen wird als heterogenes, organ- und differenzierungs-

spezifisches Glycoprotein (MG: 25 - 30kD; Hoessi et al., 1980) exprimiert. Der konstante Proteinanteil von 105 AS (Campbell et al., 1979) entsprechend 12,5kD (Kuchel et al. 1978) ist wahrscheinlich von einem Gen auf Chromosom 9 kodiert (Blankhorn & Douglas, 1972). Die Verankerung in der Zellmembran wird durch eine kovalente Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) ermöglicht (Tung et. al., 1986).

Analoge Membranproteine wurden bei der Ratte (Douglas, 1972), beim Hund und beim Menschen (Dalchau & Fabre, 1979) zunächst durch Kreuzreaktionen mit xenogenen Antisera entdeckt und später aufgrund der elektrophoretischen Mobilität und mittels monoklonaler Antikörper näher charakterisiert (McKenzie & Fabre, 1981a,b). Dabei zeigte sich eine speziesspezifisch unterschiedliche Gewebeverteilung. So ist das Theta-Antigen, im Gegensatz zur Ratte und der Maus, auf menschlichen T-Zellen nicht nachweisbar. Dagegen ist seine Expression auf Hirnzellen (Dalchau & Fabré, 1979) und auf Fibroblasten (Cotmore et al., 1981) in der Evolution der unterschiedlichen Arten stark konserviert. Interessant ist auch die Tatsache, daß das Theta-Antigen Sequenzhomologien aufweist mit den vermutlich durch Genduplikation entstandenen Domänen auf Immunglobulinen, auf dem MHC class I-Molekül sowie auf dem β 2-Mikroglobulin (Williams & Gagnon, 1982).

Einige Autoren haben eine mögliche funktionelle Korrelation zwischen dem Theta-Antigen der Maus und dem CD3-Molekül beim Menschen vermutet (Gunter et al., 1984; Norcross et al., 1984). Sie stützen sich dabei vornehmlich auf Untersuchungen der T-Zell Aktivierung durch Antikörper gegen Thy-1, wie dies ähnlich für das T-Zell-Rezeptor assoziierte CD3-Molekül beschrieben ist (Meurer et al., 1983). Dies erscheint naheliegend, da der oben erwähnte Membrananker PIP₂ bei der Zellaktivierung allgemein eine zentrale Rolle spielt. Meurer et al. (1983) lassen dabei aber die Tatsache außer acht, daß keinerlei

biochemische Ähnlichkeit zwischen dem murinen Theta- und dem humanen CD3-Molekül besteht, während andererseits ein Theta-Homolog beim Menschen beschrieben worden ist (Dalchau & Fabre, 1979); die physiologische Bedeutung von Thy-1 bleibt trotz zahlreicher Untersuchungen (z.B. Krocze et al., 1986) bis heute unbekannt.

Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz monoklonaler anti-Thy-1 Antikörper bei der Knochenmarkstransplantation im Mausmodell ist der experimentelle Befund von Thierfelder (1977), daß das Theta-Antigen bei der Maus - im Gegensatz zur Ratte - nicht oder nur in geringem Umfang auf Knochenmarkstammzellen exprimiert wird. Auf diese Weise ist sichergestellt, daß entsprechende Antikörper nur die Zellen erkennen, die die GvH vermitteln.

Eine Prophylaxe der GvH erfordert aber neben dem spezifischen Erkennen der Zielzellpopulation auch deren sichere Elimination aus dem Milzzell/Knochenmarkgemisch in vitro. Dazu wurden bislang bei Mäusen drei unterschiedliche Techniken entwickelt:

- i) Entfernung der T-Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation nach Rosettierung an Erythrozyten mittels Antikörperbrücken (Fürfang & Thierfelder, 1986);
- ii) Zerstörung der T-Zellen mittels Toxin-konjugierter Antikörper (Vallera et al., 1982b);
- iii) Lyse der T-Zellen mittels Antikörper-abhängiger Aktivierung der Komplementkaskade (Vallera et al. 1981).

Alle diese Techniken wurden bereits mit wechselndem Erfolg beim Menschen eingesetzt (i: Pechhumer et al., 1984; ii: Filipowitch et al., 1984; iii: Prentice et al., 1984). Das gleiche gilt für Antikörper-gebundene Eisenpartikel, die es erlauben, T-Zellen durch einen Magnet spezifisch aus der Knochenmarksuspension zu entfernen (Treleuven et al., 1984).

Obwohl künstliche Antikörper-Toxin-Konjugate sehr effizient bei der Zelltötung sind, stellen sie eher ein Randgebiet dar, da die dafür notwendige, mehrere Stunden dauernde Einwirkzeit zu unspezifischer Toxizität führen kann. Physikalischen Trennmethoden andererseits scheitern z.T. an der ungenügenden Vollständigkeit.

Eine brauchbare Alternative stellt dagegen die in vitro Inkubation mit Antikörpern und lytischem Komplement dar. In der Tat wirken viele der untersuchten monoklonalen Antikörper unter diesen Bedingungen zielzell-toxisch und unterdrücken bei entsprechender Spezifität die GvH im Mausmodell (Thierfelder et al., 1985).

In der zitierten Arbeit beschrieben wir auch zwei Ratten-Antikörper (YTS 154.7.7, Cobbold et al., 1983; 30-H12, Ledbetter & Herzenberg, 1979), die bei der in vitro Inkubation keiner lytischen Komplementquelle bedürfen, um die GvH nach H-2-inkompatibler Knochenmarktransplantation vollständig zu unterdrücken. Daraus ergab sich die Perspektive, mit diesen "immunsuppressiven" Antikörpern eine in vivo Behandlung des Empfängers durchzuführen, die neben der GvH auch die HvG unterdrücken kann (Thierfelder et al., 1986).

Schon vorher wurde in unserem Labor durch Kummer (pers. Mitteilung) gezeigt, daß die von Cobbold et al. (1983) beschriebene geringe Avidität des YTS 145.7.7 sich durch Zugabe von nativem Serum signifikant steigern läßt; dieser Effekt kann durch Hitzeinaktivierung (30min bei 56°C), nicht aber durch Dialyse aufgehoben werden.

Von dieser Beobachtung ausgehend ergab sich als Ziel der vorliegenden Arbeit, die besonderen Eigenschaften der immunsuppressiven Antikörper näher zu charakterisieren. Daraus sollen sich Strategien für eine erfolgreiche Serotherapie im Mausmodell ableiten lassen, die möglicherweise auf den Menschen übertragen werden können.

Das Konzept dazu gliedert sich in zwei Punkte:

- i) Herstellung eigener xenogener Ratten-Antikörper gegen Thy-1, sowie
- ii) Vergleichende Untersuchungen ihrer Eigenschaften in vivo und in vitro.

II. Material und Methoden

II.1. Allgemeines

II.1.1. Versuchstiere

a) Maus-Inzuchtstämme

Die Tiere in Tab.1 werden durch die Tierzucht der GSF in Neuherberg zur Verfügung gestellt und in unserem Versuchstierstall versorgt.

Bez.	H-2 Haplotyp	Theta-Allotyp	Komplement
AKR/J	K ^k I ^a k S ^k D ^k	Thy-1.1	C4-Mangel ^A C5-Mangel ^B
CBA	K ^k I ^a k S ^k D ^k	Thy-1.2	C4-Mangel ^A
C57BL/6	K ^b I ^a b S ^b D ^b	Thy-1.2	-
Balb/c	K ^d I ^a d S ^d D ^d	Thy-1.2	C-Aktivität reduziert ^B

Tab.1 Verwendete Maus-Inzuchtstämme

^A Neuberger & Rajewski, 1981

^B Hamilton & Harris, 1985

Selten verwendete Mäusestämme für die Produktion von Aszitesflüssigkeit fremder Hybridome sind in Tab.3 aufgeführt.

b) Ratten-Inzuchtstamm

Für die Immunisierung und die Aszitesproduktion benötigt man den zu den verwendeten Myelomzelllinien (Tab.2) syngeneten Rattenstamm Lou/C. Dieser wurde uns freundlicherweise von Prof. Bazin (Louvain) zur Verfügung gestellt. Die Zucht konnte zunächst in unserem Institut und dann unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen von Dr. Nüssel in Neuherberg etabliert werden.

II.1.2. Zelllinien

a) Myelomzelllinien

Xenogene monoklonale Ratten-anti-Maus Antikörper produzierende Hybridome sind durch Fusion von Ratten-Milzzellen mit einer Maus-Myelomlinie (z.B. Ledbetter & Herzenberg, 1979) oder mit einer syngeneten Ratten-Myelomlinie möglich. Letztere Alternative erlaubt die Aszitesproduktion in syngeneten Ratten, während Maus/Ratten-Hybridome in vivo nur in athymischen, nackten Mäusen oder Ratten expandiert werden können. Aus diesem Grund verwendeten wir eine der beiden etablierten Ratten-Myelomlinien (Tab.2); beide Zelllinien wurden aus Immunozytomen der Lou-Ratte isoliert und an die für eine Fusionszelllinie (II.2.9.) spezifischen Bedingungen adaptiert.

Bez.	Ig-Produktion	Bezug	Lit.
IR 983F	-	Bazin, Louvain	Bazin (1982)
Y3-Ag1.2.3	kappa	ATCC* (RL-1631)	Galfre et al. (1978)

Tab.2 Verwendete Myelomzelllinien
 * American Type Culture Collection

b) Hybridomzelllinien

Die in Tab.3 (S.14) angegebenen, Antikörperproduzierenden Zellklone wurden im Laufe dieser Arbeit verwendet bzw. etabliert.

II.1.3. Antikörper

a) polyklonale Seren

Tab.4 enthält die in unserem Labor gewonnenen Anti-Thymocyten-Globuline sowie affingereinigte, spezies-spezifische anti-Immunglobulin-Seren.

Bez.	Spezifität	Isotyp	Fusionspartner Myelomlinie x Milz	Ascites- produktion	Bezug	Literatur
RmT1	Thy-1	R-IgG2b	IR 983F x Lou/C	Lou/C	-	diese Arbeit
RmT2	Thy-1	R-IgG2c	IR 983F x Lou/C	Lou/C	-	diese Arbeit
RmT4	Thy-1	R-IgM	Y3-Ag1.2.3 x Lou/C	Lou/C	-	diese Arbeit
RmT5	Thy-1	R-IgG2a	Y3-Ag1.2.3 x Lou/C	Lou/C	-	diese Arbeit
30-H12	Thy-1.2	R-IgG2b	P3-NS/1-Ag4-1 x Lou/M	Balb/nu	ATCC* (TIB 107)	Ledbetter & H. (1979)
HO-13-4	Thy-1.2	M-IgM	P3X63-Ag8 x AKR/J	(Balb/c x AKR/J)F1	ATCC (TIB 99)	Marshak-R. (1979)
MRC Ox7	Thy-1.1	M-IgG1	P3-NS/1-Ag4-1 x Balb/c	Balb/c	Hunt, Williams	Mason & W. (1980)
RmL1	Lyt-1	R-IgG2b	Y3-Ag1.2.3 x Lou/C	Lou/C	-	Siebrecht (1986)
RG 7/1.30	R-IgG2a	M-IgG2b	P3-NS/1-Ag4-1 x SJL	(Balb/c x SJL)F1	ATCC (TIB 173)	Springer et al. (1982)
RG 7/11.1	R-IgG2b	M-IgG2b	P3-NS/1-Ag4-1 x SJL	(Balb/c x SJL)F1	ATCC (TIB 174)	Springer et al. (1982)

Tab.3 Verwendete Hybridomazelllinien
* American Type Culture Collection

Bez.	Spezifität	imm. Tier	Bezugsquelle
R-anti-M	Maus-Ig (H+L)	Ratte	affingereinigt Dianova (415-0503)
M-anti-R	Ratten-Ig (H+L)	Maus	affingereinigt Dianova (212-0503)
K-ATG	Maus-Thymozyten	Kaninchen	Ig-Fraktion (Rödt et al., 1974)
R-ATG	Maus-Thymozyten	Ratte	(NH ₄) ₂ SO ₄ -Präz.
M-ATG	AKR/J-Thymozyten	Balb/c	(NH ₄) ₂ SO ₄ -Präz.

Tab.4 Verwendete polyklonale Seren

b) monoklonale Antikörper

Neben den Produkten der in Tab.3 angegebenen Hybridomzelllinien konnte ich im Laufe der Arbeit auf die in Tab.5 angegebenen Antikörper zurückgreifen.

Bez.	Spezifität	Isotyp	Lit. bzw. Bezug
YTS 154.7.7	Thy-1	R-IgG2b	Cobbold et al. (1983)
63-002	Thy-1.2	M-IgG2a	Miles (Frankfurt)
Marg 2c	Ratten-IgG2c	M-IgG1	Serotec (Wiesbaden)
Marm 4	Ratten-IgM	M-IgG1	Serotec (Wiesbaden)

Tab.5 Verwendete monoklonale Antikörper

II.1.4. Einzelzellpräparation

a) periphere lymphatische Organe

Alle Präparationsschritte erfolgen unter keimarmen Bedingungen: Milzen, Thymi und (inguinale, axilläre, mesenteriale und mandibuläre) Lymphknoten werden frisch getöteten Tieren in toto entnommen und mit dem Kolben einer Spritze durch ein rostfreies, flaches Stahlsieb (Maschenweite: 0,25mm) in eine Petrischale mit ca. 10ml Puffer passiert. Gewebefetzen und verbleibende Zellaggregate entfernt man durch Filtration durch einen Schlinggaze-Tupfer (Hartmann) und/oder durch Spontan-sedimentation in einem Falcon-Röhrchen. Nach einer Zentrifugation von 10min bei 280 x g wird der Überstand abgesaugt und das Sediment in wenig Flüssigkeit mit einer Pasteurpipette resuspendiert, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit Puffer aufgefüllt. Die gleiche Waschprozedur wird nochmals wiederholt.

Die Zellzählung erfolgt nach einer 1:20-Verdünnung mit 3%iger Essigsäure in einem Hämozytometer, die Ausbeute beträgt - abhängig vom Stamm und Alter der Tiere - ca. 30 Mio. Zellen pro Thymus- bzw. Lymphknotenpräparation und ca. 100 Mio. pro Milz bei der Maus.

Eine Vitalitätsrate von über 90% ist Voraussetzung für die weitere Verwendung der Zellen. Daher wird bei Lymphknotenpräparationen routinemäßig eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Kurnick et al., 1979). Dazu wird das gewaschene Zellpellet in ca. 4ml einer 1,034g/ml dichten Percoll-Verdünnung (Bio Rad, München) aufgenommen und 10min bei 120 x g zentrifugiert. Das Sediment enthält die lebendigen Zellen und wird nach Absaugen des Überstandes durch zweimaliges Waschen mit Puffer von restlichem Percoll gereinigt.

b) Knochenmark

Für die Gewinnung von Knochenmarkzellen werden Femur- und Tibiaknochen von Haut- und Muskulatur freigelegt, an beiden Enden gekappt und durch wechselseitiges Ansetzen einer blauen Kanüle mit 10ml Puffer gespült. Die Markzylinder zerlegt man durch zweimalige Aspiration durch die Kanüle in Einzelzellen. Die weitere Behandlung wird wie oben beschrieben durchgeführt. Man erhält auf diese Weise ca. 50 bis 100 Mio.Zellen/Maus.

c) menschliche periphere mononukleäre Zellen

Frisch gewonnenes, heparinisiertes Blut (100U/ml) wird mit dem gleichen Volumen 37°C warmen PBS (II.1.1.) versetzt. Von der Mischung legt man je 21ml vorsichtig mit einer Pipettierhilfe auf 9ml einer isotonen Ficoll-Paque Lösung (Pharmacia, Freiburg) in einem 50ml Falcon-Röhrchen und zentrifugiert für 30min bei 400 x g. Dabei sammeln sich die Erythrozyten im Pellet, die Lymphozyten in der Interphase (Boyyum, 1968). Dieser Ring wird vorsichtig mit möglichst wenig Volumen abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (10min, 280 x g).

II.2. Herstellung und Produktion monoklonaler Antikörper

II.2.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Der Umgang besonders mit langsam wachsenden eukaryontischen Zelllinien stellt hohe Anforderungen an die Keimfreiheit bei den einzelnen Arbeitsschritten. Daher werden die Kulturflaschen (Costar, Holland) und -platten (Flachboden, Costar), sowie alle Medien nur unter einer sogenannten sterilen Werkbank mit sterilen Einmalpipetten (Costar) und Pipettierhilfe manipuliert und alle Gerätschaften häufig abgeflammt. Für kleine Volumina verwendet man gestopfte, autoklavierte Pasteurpipetten bzw. ungestopfte zum Absaugen von Kulturüberstand mittels einer Membranpumpe. Das Beschicken von Kulturplatten mit kleinen, konstanten Volumina erfolgt mit sterilen Combitip-Pipetten (Eppendorf, Hamburg).

Der Arbeitsraum sollte zusätzlich eine möglichst niedrige Belastung mit Keimen aufweisen, was durch tägliches, gründliches Reinigen des Bodens mit einem Desinfektionsmittel (Perform, Schülke & Mayr, Norderstedt) und einer nächtlichen UV-Bestrahlung ermöglicht wird. Um Kontaminationen des Arbeitsplatzes durch Übertragung aus dem Wasserbad nach Aufwärmen der Medienflaschen zu minimieren, wird dem Wasser nach Angaben des Herstellers "Aqua-Stabil" (Julabo-Labortechnik, Seelbach) zugesetzt.

Der pH-Wert in den Kulturmedien ist durch ein Bicarbonatsystem gepuffert, was eine konstante Begasung mit 5% CO₂ im Brutschrank erfordert; daher müssen alle Kulturflaschen mit nur lose aufgeschraubtem Deckel bebrütet werden. Der möglichen Verdunstung wird durch eine hohe Luftfeuchtigkeit entgegengewirkt, die im Brutschrank

auf ca. 95% konstant gehalten ist. Dies geschieht in unseren Brutschränken (Cytoperm; Haereus, Osterode) durch eine besondere Technik, die große Kondensationspunkte auf den Innenflächen des Schrankes vermeidet, was eine potentielle Kontaminationsgefahr bedeuten könnte; zudem ist der Cytoperm sterilisierbar. Die Parameter Luftfeuchtigkeit, CO₂ und Temperatur sind kritische Punkte für das Zellwachstum und sollten daher häufig überprüft und durch möglichst seltenes Öffnen des Brutschrankes konstant gehalten werden.

II.2.2. Wachstumsmedium

Das Medium wird in größeren Mengen angesetzt und bei -20°C gelagert, wo es über längere Zeit stabil ist. Eine aufgetaute Flasche wird bei 4°C aufbewahrt und jedesmal vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. In diesem Zustand sollte das Medium aufgrund des Zerfalls von Glutamin innerhalb von 14 Tagen verbraucht sein, muß aber spätestens verworfen werden, wenn der pH-Wert durch Entweichen von CO₂ aus dem Bicarbonatpuffer alkalisch geworden ist. Dies zeigt der Indikator durch violette Färbung an.

Der kritischste Bestandteil des Mediums ist die Serumquelle, in unserem Fall fötales Kälberserum (FKS), das von Charge zu Charge große Qualitätsunterschiede in Bezug auf die Unterstützung des Zellwachstums aufweist und deshalb vor Bezug einer größeren Menge auf seine Eignung für die Hybridomzellkultivierung ausgetestet werden muß. Wir setzen im Normalfall hitzeinaktiviertes FKS ein. Dazu wird eine Originalflasche aufgetaut, auf 37°C erwärmt und 45min im Wasserbad bei 56°C unter wiederholtem Schütteln inkubiert.

Die Herstellung und Aufbewahrung von HCM erfolgt in den mit dem Basismedium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) gelieferten Glasflaschen mit den eingestellten Originallösungen für die Zellkultur nach folgender Rezeptur:

- 400ml DMEM (041-1965; Gibco, Karlsruhe)
- 100ml FKS (Flow; hitzeinaktiviert, 56°C, 45min)
- 5ml Penicillin, Streptomycin (043-5140; Gibco)
- 5ml Na-Pyruvat (043-5030; Gibco)
- 5ml nicht essent. Aminosäuren (043-1140; Gibco)
- 5ml Glutamin (043-5030; Gibco)

II.2.3. Makrophagenpräparation

Makrophagen verwendet man in der Zellkultur als sogenannte "feeder-cells", die die Vermehrung von autonom wachsenden (Einzel-) Zellen - besonders in der vulnerablen Phase nach der Fusion - unterstützen und zusätzlich abgetötetes Material eliminieren.

Alle Präparationsschritte müssen bei 4°C in vorgekühlten Gefäßen durchgeführt werden, um die Adhärenz der Makrophagen an die Plastikoberfläche zu vermeiden. Die mit Äther getöteten Ratten werden nach Desinfektion mit 70%igem Alkohol unter einer sterilen Werkbank in Rückenlage auf einem Korkbrett fixiert. Das Fell wird vorsichtig ohne Verletzung der Bauchdecke mit einem sterilen Besteck von der Mittellinie aus nach links und rechts aufpräpariert und in Form einer Tasche festgesteckt. Die Spülung der Bauchhöhle erfolgt durch Injektion

tion von ca. 50ml eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung und leichter Massage der Bauchdecke. Ein Großteil der Flüssigkeit wird über eine gelbe Kanüle mit der bei der Injektion verwendeten Spritze aus der nicht geöffneten Bauchhöhle abgesaugt, die verbleibende Menge läßt man bei Bedarf durch einen seitlichen Schnitt in die vorbereiteten Taschen laufen, von wo sie leicht abpipettiert werden kann.

Die abzentrifugierten peritonealen Zellen (5min, 280 x g) werden in 10ml eiskaltem Medium aufgenommen und üblicherweise - nach Zählung einer 1:20-Verdünnung in 3%iger Essigsäure - auf 200.000 Leukozyten(!)/ml eingestellt; die Gesamtausbeute einer erwachsenen männlichen Ratte beträgt zwischen 5 und 10 Mio. Leukozyten. Von dieser Zellsuspension werden je 100ul pro Kavität auf eine 96-well Kulturplatte bzw. 1ml pro Kavität auf eine 24-well-Platte verteilt. Der Ring der äußeren Kavitäten ist aufgrund der hohen Verdunstungsverluste in den Brutschränken für eine Zellkultivierung ungeeignet und wird mit einem gleichen Volumen keimtötender 10%iger CuSO_4 -Lösung gefüllt.

Nach 24 Stunden Bebrütung kann der Erfolg der Präparation kontrolliert werden, um ungeeignete Platten mit Kontaminationen zu verwerfen.

II.2.4. Flaschenkultivierung

Wir arbeiten je nach Anforderung mit drei verschiedenen Größen von Zellkulturflaschen mit 25, 75 bzw. 150cm² Wachstumsfläche, die wir mit maximal 7, 40 bzw. 100ml Kulturflüssigkeit beschicken.

Ziel jeder Flaschenkultivierung als Vorbereitung der Zellen für die Fusion (II.2.9.), zur Reklonierung (II.2.5.), zur Kryokonservierung (II.2.6) oder zur Ascitesproduktion (II.2.7) ist die Gewinnung einer ausreichenden Zellmenge in optimalem Zustand. Dazu dient die tägliche Kontrolle möglicher Kontaminationen, der Zellmorphologie und des Wachstumsverhaltens unter dem Invertmikroskop sowie die Bestimmung der Zellzahl bzw. -vitalität nach Trypanblaufärbung (1:2 Verdünnung in 0,36%igem Trypanblau, angesetzt in physiologischer Kochsalzlösung) in einem Hämozytometer. Besonders die Teilungsrate ist ein Indiz für die Kondition der Zellen und sollte unter gleichen Bedingungen über mehrere Tage konstant sein, was einer logarithmischen Wachstumsphase entspricht. Durch tägliche Volumenexpandierung bzw. Verdünnung der Kultur wird die Zelldichte auf einen konstanten Wert eingestellt, typischerweise zwischen 300.000 und 500.000 Zellen/ml, so daß nach 24-stündiger Bebrütung ca. 1 Mio. Zellen/ml zu erwarten sind.

Ist dabei das Medium "verbraucht", was sich an der Gelbfärbung des Indikators durch Übersäuerung mit Stoffwechselendprodukten zeigt, wird die erforderliche Zellmenge durch einstündige Sedimentation in der schräg gestellten Kulturflasche oder durch Zentrifugation (5min, 280 x g) gesammelt und in frischem Medium aufgenommen.

II.2.5. Reklonierung

Die Reklonierung auf Einzelzellniveau ist erforderlich zur Sicherstellung der Monospezifität eines positiven Klonen nach einer Fusion bzw. nach längerer in vitro Passage einer Kultur, die durch nicht-produzierende Mutanten überwuchert werden könnte.

Dazu wird eine logarithmisch wachsende Kultur in einzelnen Verdünnungsschritten (1:10) auf einen Titer von 10 Zellen/ml (=1 Zelle/100ul) eingestellt und je 100ul auf eine 96-well Kulturplatte ausgesät, die 24h vorher mit 100ul syngenem Makrophagen (II.2.3.) beschickt worden ist. Die Platten werden im Brutschrank inkubiert und ca. alle vier Tage durch Absaugen von je ca. 100ul Kulturüberstand und Zugabe des gleichen Volumen an frischem Medium gefüttert. Dadurch wird verbrauchtes Medium ersetzt und ein Verdunstungsverlust ausgeglichen.

Klonwachstum ist ungefähr nach einer Woche im Invertmikroskop sichtbar. Aus den positiven Kavitäten, die nur teilweise mit Hybridomzellen bewachsen sein müssen (Siebrecht, 1986), werden 100ul Kulturüberstand abgenommen und in einer 1:5 Verdünnung im direkten Inhibitions-RIA (II.4.4.b) auf Antikörper-Spezifität und/oder im indirekten Bindungs-RIA (II.4.4.c) auf Immunglobulin-Produktion ausgetestet. Klone, bei denen die gewünschte Antikörpersynthese mit gutem Wachstum korreliert, werden mit einer Pasteurpipette auf je zwei mit Makrophagen vorbereitete (II.2.3.) Kavitäten einer 24-well Kulturplatte überimpft; wenige Tage später sollte die ganze Wachstumsfläche mit Zellen bedeckt sein. Nach nochmaligem, vergleichenden Austesten wird der nach Maßgabe des Antikörpertiters und des mikroskopischen Erscheinungsbildes beste Klon auf Flaschenkultivierung umgestellt und durch Kryokonservierung (II.2.6) der korrespondierenden Kavität gesichert.

II.2.6. Kryokonservierung

Hybridomzellen aus der in vitro Kultivierung bzw. aus der Aszitesflüssigkeit können in geeignetem Einfriermedium bei -196°C in flüssigem Stickstoff unter Bewahrung ihrer Vitalität aufbewahrt werden. Das Einfriermedium wird in größeren Mengen aus 90% inaktiviertem FKS und 10% DMSO (für Gaschromatographie; 9678, Merck, Darmstadt) angesetzt und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt, ebenso das DMSO nach Öffnen der Originalflasche.

Der Einfriervorgang beginnt mit dem Sammeln der vorher gezählten Zellen durch Zentrifugation (5min, $280 \times g$). Die Zellen aus dem Pellet oder aus der vorher abgesaugten Kavität einer 24-well Platte werden in einem entsprechenden Volumen eiskalten Einfriermediums aufgenommen, gut resuspendiert, zu 1ml (ca. 10^7 Zellen) in verschraubbare Kryoröhrchen (1,5ml; Nunc, Wiesbaden) abgefüllt und in einer automatischen Flüssigstickstoffgefrierereinheit (Union Carbide, USA) nach Maßgabe des Herstellers auf -100°C abgekühlt, wobei durch kontrolliertes Umspringen der Kühlrate am Gefrierpunkt (-8°C) die Kristallbildung zellschonend abläuft. Danach können die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgt in einem 37°C warmen Wasserbad. Sofort nach Verflüssigung wird die Zellsuspension in ein kleines Falcon-Röhrchen überführt, tropfenweise auf ein zehnfaches Volumen mit eiskaltem DMEM (II.2.2) verdünnt, abzentrifugiert (5min, $280 \times g$) und der Überstand abgesaugt. Die Zellen können jetzt entsprechend den Bedingungen vor der Konservierung mit Medium weitergezüchtet bzw. zur Aszitesproduktion (II.2.7.b) verwendet werden.

II.2.7. Massenproduktion monoklonaler Antikörper

a) Kulturüberstand

Prinzipiell besteht für viele Fragestellungen die Möglichkeit auf den Kulturüberstand einer Hybridomkultur als Antikörperquelle zurückzugreifen; für die meisten in vitro Testsysteme ist der Antikörpergehalt mehr als ausreichend. Zudem führt das Fehlen anderer Immunglobuline der gleichen Spezies zu einer niedrigen unspezifischen Bindung. Normalerweise läßt sich so eine Konzentration von etwa ca. 1-10ug/ml erzielen (Fazekas et al., 1980).

Ist es notwendig, größere Mengen Antikörper z.B. für präparative Zwecke (II.4.1.) zu gewinnen, beschicken wir große Kulturflaschen mit 200ml einer logarithmisch wachsenden Kultur und lassen diese ca. zwei Wochen bebrüten. Die dann toten Zellen werden gut abzentrifugiert (10min, 1000 x g) und der Überstand durch ein Vorfilter (AP 2504700, Millipore, Neuhausen) gesaugt und so von restlichen Zellen und Zellfragmenten gereinigt. Die Ausbeute kann so um den Faktor 10 gesteigert werden.

b) Aszites

Zur Produktion großer Antikörpermengen bietet sich die in vivo Passage der Hybridomzellen zur Aszitesbildung an (Fazekas et al., 1980).

Dazu werden syngene männliche Tiere oder, falls nicht möglich, athymische, nackte Mäuse mit einer i.p.-Injektion Pristane (1ml/Ratte, 0,5ml/Maus; Roth, Karlsruhe) vorbehandelt. Ca. 14 Tage später erfolgt die Injektion von 10^7 Hybridomzellen aus der Flaschenkultur (II.2.4.) in 1ml physiologischer Kochsalzlösung in die Bauchhöhle. Nach weiteren 10 bis 14 Tagen wird die Entwicklung der Aszitestumore durch ein rasch zunehmendes Aufblähen des Bauches sichtbar. Im Gegensatz zu Mäusen ist der Zeitpunkt des Erntens der Ascitesflüssigkeit bei Ratten sehr kritisch, da die Tiere schnell sterben.

Das Anzapfen lebendiger Tiere führt bei Ratten zu nicht befriedigenden Ergebnissen. Daher wird die Flüssigkeit aus der Bauchhöhle der getöteten Tiere gesammelt, nachdem Fell und Bauchdecke wie bei der Makrophagenpräparation (II.2.3.) eröffnet worden sind. Nach Entfernen der Zellen (10min, 400 x g), die wiederum in nicht vorbehandelte Tiere zur Weiterpassagierung übertragen werden können, wird der Aszites 1h bei 37°C und über Nacht im Kühlschrank abgesert. Gerinnsel werden nun durch erneute Zentrifugation (15min, 1000 x g) entfernt und die Ascitesflüssigkeit bei -20°C tiefgefroren.

Die Antikörperkonzentration in der sog. 0. Passage in vitro kultivierter Zellen beträgt üblicherweise zwischen 1 und 10mg/ml - gemessen an der daraus gereinigten Menge an Antikörper - und fällt bei weiteren Passagen ab. Überhaupt führt das Ansetzen weiterer Passagen zumindest bei Ratten häufig zu aggressiven Tumoren, die keine brauchbare Aszitesflüssigkeit liefern.

II.2.8. Immunisierung

Die einfachste Art der Immunisierung gegen eine membranständige Determinante ist die Injektion ganzer Zellen; Voraussetzung dafür ist eine sinnvolle Dichte und eine genügende Immunogenizität des Antigens. Wegen der Vielzahl der Immunogene verlangt diese Methode zwar einen größeren Aufwand bei der Suche nach spezifischen Klonen, ist aber im Gegensatz zur Präparation des Antigens leicht zu verwirklichen. Zudem werden die Epitope in ihrem nativen Zustand präsentiert, was nach den Reinigungsschritten von Membranproteinen nicht unbedingt sicher ist. Wir arbeiteten immer mit Balb/c-Thymozyten, einer quasi-homogenen Zellpopulation, die das Thy-1-Antigen in einer großen Dichte exprimiert.

Das Immunisierungsschema wurde mehrmals geändert, wobei hauptsächlich die Zeiten zwischen den Injektionen stark variierten. Grundsätzlich richtete es sich nach dem von Springer et al. (1978) beschriebenen Modus. Im einzelnen läßt es sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Priming mit 10^7 Zellen i.p.
2. Auffrischung mit 10^7 Zellen i.p./i.v.; 3.-6. Woche
3. Boost mit 10^7 Zellen i.v.; 6.-9. Woche

Vier Tage nach dem letzten Boost erfolgte die Fusion.

II.2.9. Fusion

Diese Methode beruht auf der Verschmelzung von Antikörper-produzierenden B-Zellblasten mit autonom wachsenden (Myelom-) Zellen (Köhler & Milstein, 1975). Zur Selektion der Hybridzellen von unfusionierten Myelomzellen weisen letztere einen Defekt in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) bzw. in der Thymidin-Kinase (TK) auf; sie sind also resistent gegen 8-Azaguanin bzw. Bromdesoxy-uridin. Nach erfolgter Fusion wird in einem Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthaltendem Selektionsmedium (Littlefield, 1964) mit Aminopterin die de novo Bildung von Nukleotid-Bausteinen gehemmt, während mit Hypoxanthin bzw. Thymidin zwei präformierte Vorstufen für die Purin- bzw. Pyrimidin-Synthese angeboten werden. Diese sind nur für die HGPRT⁺ bzw. TK⁺ Myelom-Lymphozyten-Hybridome verwendbar, nicht jedoch für unfusionierte Myelomzellen bzw. Myelom-Myelom-Hybride; nicht fusionierte B-Zellen zeigen in vitro unter diesen Bedingungen nur geringe Teilungsaktivität und sterben innerhalb kurzer Zeit ab.

Die Fusion erfolgt nach einem modifizierten Schema von Galfre et al. (1977) und ist bei Siebrecht (1986) im einzelnen beschrieben. Falls nicht anders angegeben, erfolgen alle Manipulationen in PBS mit 2% hitzeinaktiviertem FKS bei Raumtemperatur: die Milz wird unter sterilen Bedingungen aus der Ratte entnommen und durch ein Stahlsieb gedrückt (II.1.5.a). Die Einzelzellsuspension wird dreimal mit je 20ml Puffer in großen Falcon-Röhrchen gewaschen und anschließend Zellzahl bzw. -vitalität bestimmt.

Die Fusion beginnt mit der Zugabe der 0,6-fachen Menge an gewaschenen Myelomzellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur, die vor nicht allzu langer Zeit für ca. 10 Tage durch 0,13mM 8-Azaguanin-haltiges Medium

(A-5284; Sigma) passagiert worden ist, um die HGPRT-Defizienz zu gewährleisten. Die gemischte Zellsuspension wird einmal zusammen abzentrifugiert (5min, 280 x g), der Überstand abgesaugt und das Pellet durch leichtes Schütteln des Röhrchens gelöst. Der eigentliche Vorgang, der zur statistischen Fusion der Zellen führt, findet statt durch langsames, über 30sec verteiltes Zutropfen von 0,8ml einer 37°C warmen, HEPES-gepuffertem 50%igem Polyethylenglykol (PEG 1500) (Kadish & Wenc, 1983; 783641; Boehringer, Mannheim). Währenddessen werden die Zellen durch leichtes Tippen des Röhrchens auf die Tischplatte durchmischt. Die Fusion wird nach 1min beendet und das PEG mit serumfreien Medium langsam unter ständigem Schütteln nach folgendem Zeitschema herausverdünnt:

1ml über 30sec

3ml über 30sec

10ml über 60sec

Die Zellen werden nun abzentrifugiert (8min, 280 x g), in HAT-Selektionsmedium (H-0262; Sigma) vorsichtig resuspendiert und auf eine mit Makrophagen vorbereitete 96-well Kulturplatte (II.2.3) mit einer Zellzahl von 10^5 /Kavität ausplattiert. Die Platten werden täglich beobachtet und bei Bedarf gefüttert.

Nach einigen Tagen, die durch Absterben der nicht fusionierten Zellen und entsprechender Makrophagentätigkeit gekennzeichnet sind, kann man im Invertmikroskop kleine Klone erkennen. Sobald diese einen deutlichen Teil der Wachstumsfläche einnehmen, ca. nach 14 Tagen, werden die Kulturüberstände aus den individuellen Kavitäten in einem Inhibitions-RIA (II.4.4.b) mit ^3H -markiertem anti-Thy-1 Antikörper (YTS 154.7.7) ausgetestet. Positive Klone werden auf einer 24-well Kulturplatte weitergezogen, wie es in II.2.5 beschrieben ist, wobei die Zellen über eine mehrtägige Fütterung mit

Aminopter-in-freiem HT-Medium (H-0137; Sigma) auf Normalmedium umgestellt werden. Von der 24-well Platte können die Zellen kryokonserviert (II.2.6.) oder in Flaschen expandiert werden (II.2.4.).

II. 3. In vivo Versuche

II.3.1. Knochenmarktransplantation

Die Transplantation einer reinen Knochenmarkszellsuspension, wie sie experimentell bei Mäusen gewonnen werden kann, führt bei allogener Übertragung zu einer chronischen Mortalität. Eine akute GvH, deren Unterdrückung in dieser Arbeit untersucht werden soll, erfordert die Zugabe reifer Spender-T-Zellen, z.B. aus der Milz, so daß im folgenden unter dem Begriff "Knochenmarktransplantation" die Übertragung eines Milzzell/ Knochenmarkgemisches verstanden werden soll.

Die Behandlung richtet sich nach folgendem Schema (Thierfelder et al., 1986): 24h vor der Transplantation werden die Empfängertiere durch eine $^{137}\text{Cäsium}$ -Quelle (HWM-D-2000; Gammacell, Kanada) mit 850rad bestrahlt (Gammaleistung: 107rad/min bei 35cm Abstand von den symmetrisch liegenden Quellen). Diese Ganzkörperdosis zerstört die Hämatopoese, was innerhalb von ca. 3 Wochen zum Tod aller Tiere führen würde, ohne andere Organe irreversibel zu schädigen; die so behandelten Mäuse überleben also nach erfolgreicher (z.B. syngener) Knochenmarktransplantation. 4h nach der Bestrahlung wird den Tieren der zu testende Antikörper in Form von 0,25ml Aszitesflüssigkeit (ca. 1mg Antikörper) appliziert.

Einen Tag später erfolgt die Transplantation durch Injektion von 50 Mio. Milz- und 20 Mio. Knochenmarkzellen in L15-Medium (12/700; Boehringer, Mannheim) in die Schwanzvene, die vorher durch Eintauchen des Schwanzes in warmes Wasser geweitet worden ist. Bei dieser Prozedur werden die Tiere in einem kleinen Becherglas an der Tischkante festgehalten.

Als Kontrollen gelten Gruppen von Tieren ohne (Strahlenkontrolle) oder mit syngener Knochenmarktransplantation. Die mittlere Überlebenszeit gibt Auskunft über das Auftreten einer akuten (ca. 20 Tage) bzw. einer chronischen Mortalität der GvH (>20 Tage). Die Käfige werden täglich kontrolliert und das Sterben der Tiere protokolliert.

Der Erfolg einer allogenen Knochenmarkübertragung wird durch eine Hautverpflanzung überprüft, wobei Haut des Knochenmarkspenders im Gegensatz zu einem Transplantat eines Dritt-Stammes nicht abgestoßen wird.

II.3.2. Hauttransplantation

Die Überlebenszeit von Hauttransplantaten gibt sehr sensitiv Auskunft über die Stärke der zellulären Immunreaktion der Empfängermaus gegen Spendergewebe und ist experimentell nur schwer zu verzögern.

Die immunsuppressive Therapie besteht aus i.p. Injektionen von je 0,25ml Ascitesflüssigkeit (ca. 1mg aktiver Antikörper) oder einer äquivalenten Menge an polyklonalem Serum. Die Behandlung beginnt mit dem Tag der Transplantation und wird dreimal wöchentlich wiederholt.

Die Schwanzhaut frisch getöteter Mäuse des Spenderstammes wird als Ganzes nach einem zirkulären Schnitt an der Schwanzwurzel und einem Längsschnitt abgezogen, sofort in physiologische Kochsalz-Lösung überführt und in ca. 1cm² große Stücke geschnitten.

Die Empfängertiere werden je nach Größe durch i.p.-Injektion mit 3 bis 6mg Evipan-Natrium (Bayer, Leverkusen) in 0,25ml physiologischer NaCl-Lösung betäubt. Mit

einer spitzen Schere wird jetzt ein der Größe der vorgesehenen Transplantate entsprechender Hautbezirk von der Subcutis abpräpariert. Auf die Wundflächen legt man das vorbereitete Hautstück so, daß die entsprechenden Ränder aufeinanderliegen. Die Wunde wird mit Vaseline imprägnierter Gaze abgedeckt und darüber ein Zellstoffpolster mit Leukovlies fixiert. Zum Schluß wird die Maus mit Leukoplast bandagiert.

Nach 12 Tagen wird der Verband zum ersten Mal abgenommen und das Transplantat auf Anzeichen einer beginnenden Abstoßung untersucht. Weitere Kontrollen folgen in zweitägigem Abstand, wobei die Wunde solange versorgt werden muß, bis keine Beeinflussung des Transplantats durch äußere Einwirkungen mehr zu befürchten ist.

Als Überlebensdauer gilt der Zeitraum bis zu der Kontrolle, bei dem mindestens die Hälfte des Transplantates deutliche Abstoßungserscheinungen zeigt. Dies zu beurteilen setzt eine große Erfahrung des Experimentators voraus.

II.3.3. Opsonisierungstest

Dieser Versuch soll die Frage nach dem Schicksal transplantierte Lymphozyten beantworten (Taub & Lance, 1968), besonders im Hinblick auf die Wirkung von Antikörpern im Rahmen der Knochenmarktübertragung (Rödt, 1979). Daher entspricht die Empfängervorbehandlung (Bestrahlung, Antikörper- und Zellinjektion) dem Schema, wie es für die Knochenmarktransplantation beschrieben ist (II.3.1.). Die Präparation der Thymozyten und die Chromierung erfolgt nach den Angaben in II.1.4 bzw. II.4.5. Bei der Vielzahl der Manipulationen gehen ca. 50%

der Zellen verloren, was bei der Berechnung der Zellmenge für den Chromierungsansatz von Bedeutung ist. Es werden 0,3mCi $\text{Na}_2(^{51}\text{Cr})\text{O}_4$ (10mCi/ml; NEN Du Pont, Dreieich) für 100 Mio. Zellen in 100ul Hepes gepuffertem MEM (041-2370; Gibco) eingesetzt; bei der großen Zellmenge muß häufig während der Inkubation geschüttelt werden. Pro Maus werden ca. 10 Mio. Zellen (ca. 1 Mio. cpm) gespritzt.

Entsprechend der vorgegebenen Zeitkinetik wird je eine Maus pro Gruppe mit Äther getötet, der Brustraum eröffnet und nach Anschneiden des Herzbeutels ca 0,6ml Blut mit einer Heparin-benetzten Kanüle entnommen und davon definiert 0,4ml durch Zentrifugation in Separationsröhrchen (Mikrotainer; Becton & Dickinson, Heidelberg) in Plasma und Zellen getrennt. Danach werden die Organe (Milz, Leber, eventuell Niere) herauspräpariert und in Plastikreagenzröhrchen überführt. Die Auswertung der Radioaktivität in den einzelnen Präparationen erfolgt in einem Auto-Gamma-Szintillationsspektrometer (5230; Packard, Frankfurt).

II.4. In vitro Untersuchungen

II.4.1. Reinigung monoklonaler Antikörper

Verwendung findet die zeitaufwendige aber unkritische Methode der präparativen Blockelektrophorese, die von Müller-Eberhard & Kunkel (1956) entwickelt und von Kummer et al. (1984) in unserem Labor eingeführt worden ist.

Das dazu verwendete Puffersystem (Svendsen, 1973) zeichnet sich durch eine hohe Kapazität bei niedriger Ionenstärke aus, was eine nur geringe pH-Verschiebung während der Elektrophorese bedingt. Das System besteht aus zwei Puffern:

Puffer 1: 65g Na-Barbital und 10,35g Barbital gelöst in ca. 4l heißem H₂O

Puffer 2: 281g Glycin und 226g Tris gelöst in ca. 4l H₂O

Die beiden Puffer werden zusammen durch ein Papierfilter über eine Fritte gesaugt und auf 10l aufgefüllt; der pH beträgt 8,8, die Ionenstärke 0,08.

Je 600g Pevicon (C870; Serva, Heidelberg) und Polyvinylchlorid (PVC, Roth, Karlsruhe, Nr. 9163) werden in Wasser aufgeschlämmt. Das neu angesetzte oder ein schon gebrauchtes Gemisch wird dreimal mit einem ca. fünffachen Überschuß an aqua dest. gewaschen und anschließend auf einem Filterpapier in einer großen Fritte durch Unterdruck getrocknet.

Die mit wenig Svendsen-Puffer breiig angerührte Masse wird sofort in eine 1,2 x 48 x 24cm große Plastikwanne gegossen, in deren Enden Puffer-getränkte Tücher (z.B.

Bonline; Johnson & Johnson) eingelegt sind, die bei der Elektrophorese als Strombrücken dienen. Das frisch gegossene Gel bleibt - mit einer Plastikfolie als Verdunstungsschutz abgedeckt - über Nacht im Kühlraum bei 4°C stehen. Am nächsten Morgen wird die Matrix unter hohem Druck mit saugfähigem Papier getrocknet und die Oberfläche mit einem Schaber glatt gezogen.

Vor dem Auftragen auf die Elektrophoresematrix kann die Antikörperpräparation gegebenenfalls wie folgt vorbehandelt werden.

(i) Frigenbehandlung:

Bei der Elektrophorese und anderen Methoden der Antikörperreinigung (z.B. Ionenaustauschchromatographie) können sich die in der Aszitesflüssigkeit natürlich vorkommenden Lipide bzw. noch vorhandenes Pristan (II.2.7.b) störend auswirken und sollten nach der Methode von Bazin & Malache (1986) entfernt werden. Dazu wird die Aszitesflüssigkeit mit einem gleichen Volumen Frigen (6049; Roth) versetzt und 30min unter einer Abdeckung im Abzug gerührt, so daß sich beide Phasen durchmischen. Die anschließende Zentrifugation in einem Glastube von 10min bei 2000 x g führt zu einer sauberen Entmischung, wobei die spezifisch leichtere wässrige Phase mit einer Pasteurpipette abgenommen und durch Saugen durch ein Vorfilter (AP 25, Millipore, Neu-Isenburg) von restlichen Frigen-Lipid-Komplexen befreit wird.

(ii) Ammonsulfatpräzipitation:

Diese Prozedur ist geeignet zum Konzentrieren des Antikörpers bei gleichzeitiger Abreicherung kontaminierender Proteine. Der Kulturüberstand wird direkt, Aszitesflüssigkeit nach einer 1:2-Verdünnung mit PBS

unter Rühren tropfweise bei 4°C durch eine blaue Kanüle mit einer konzentrierten Ammonsulfat-Lösung (pH 7,2, eingestellt mit NH_3) versetzt, so daß eine Endkonzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von 50% erreicht wird. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation (30min, 10.000 x g; MSE, high speed) gesammelt, zweimal hintereinander in 45%iger Ammonsulfat-Lösung resuspendiert und zentrifugiert, danach gut abgetropft und anschließend in wenig Volumen PBS unter Schütteln bei Raumtemperatur gelöst. Restlichem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wird durch einen Lauf über eine Entsalzungssäule (Bio Gel P6-DG) entfernt.

Die vorbehandelte Probe (10 - 20ml Ascites bzw. eingengter Kulturüberstand) wird über Nacht gegen 5l Svensen-Puffer bei 4°C dialysiert, anschließend 20min bei 10.000 x g (MSE, high speed) zentrifugiert und mit einer Spur Bromphenolblau gefärbt. Danach erfolgt die Auftragung tropfweise in eine senkrecht zur späteren Stromrichtung liegende Kerbe in der Mitte der Matrix. Das Gel verbindet man anschließend über die eingelegten Strombrücken mit zwei getrennten Elektrodenkammern, die mit je 4l Svendsen-Puffer gefüllt sind. Die Matrix muß mit einer Folie luftblasenfrei abgedeckt werden, um Verdunstung zu stoppen und Tropfwasser von der Oberfläche abzuhalten. Nach 15min Äquilibration wird die Elektrophorese mit einer Feldstärke von 6V/cm gestartet. Die Stromstärke beträgt dabei ca. 50mA.

Die Proteine wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung mit oder gegen den konstanten Flüssigkeitsstrom der Elektroendosmose, die durch die negativen Ladungen am PVC bedingt ist; auf diese Weise wird eine optimale Trennung über die gesamte Gelfläche ermöglicht. Bei Asziteschargen nach Frigenbehandlung ist der gesamte Lauf um ca. 10cm/24h in Richtung Anode verschoben, gemessen an der gefärbten Albuminbande und an der später bestimmten Lage der Immunglobuline, die bei

unbehandelten Proben nach 48h bei Fraktion 18 zu finden sind, nach Frigenbehandlung jedoch an der Auftragstelle bei Fraktion 12 liegen geblieben scheinen.

Sobald die blaue Albuminbande die Anode erreicht hat - typischerweise nach 24 bis 48h - wird die Elektrophorese gestoppt und das Gel in 2cm breite Streifen geschnitten, um daraus in je einem 50ml-Falcon-Röhrchen mit 10ml PBS das Protein zu eluieren. Jede Fraktion wird in mehreren Verdünnungen ab 1:100 in einem geeigneten Radioimmunoassay (II.4.4.) ausgetestet.

Die Fraktionen mit der größten Aktivität werden vereinigt, durch eine Glasfritte gesaugt und das zurückbleibende Pevicon/PVC-Gemisch mit ca. 100ml PBS nachgewaschen. Anschließend wird die proteinhaltige Lösung durch ein Sterilfilter gedrückt (22um; Sterifex GS, Millipore, Neu-Isenburg) durch Ultrafiltration (XM 50; Amicon, Witten) auf ca. 15ml eingeeengt und auf einer Bio Gel P-6 DG-Säule (30 x 1cm) mit einer linearen Flußrate von 15cm/h von restlichen Ionen aus dem Elektrophoresepuffer gereinigt.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration dient die photometrische Extinktionsmessung bei 235 und 280nm nach der Formel von Whitaker & Granum (1980), die für reines IgG gilt:

$$\text{mg Protein/ml} = (E_{235} - E_{280}) / 2,51.$$

Die Reinheit der Präparation gibt der Quotient E_{235}/E_{280} an, der für IgG erfahrungsgemäß zwischen 2,6 und 3,0 liegen sollte (Kummer, pers. Mitteilung). Die gereinigte Antikörperpräparation wird durch Ultrafiltration auf eine Konzentration von ca. 4mg/ml eingestellt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

II.4.2. Clq-Präparation

Die von uns verwendete Methode wurde zunächst von Volonakis & Stroud (1972) für Clq aus Kaninchen entwickelt, von Zubler et al. (1976) für menschliches Clq modifiziert und von Valet (pers. Mitteilung) zusammengestellt.

Zwei Eigenschaften von nativem Clq werden bei der Präparation durch die Zusammensetzung der Puffer (Tab.6) ausgenutzt:

- i) Das Makromolekül ist in vivo stabilisiert durch Ca^{2+} , zerfällt also in seine Untereinheiten (Clq, Clr, Cls) bei Zugabe von EDTA.
- ii) Clq ist schwerlöslich in niederionischen Lösungen und kann so selektiv gefällt werden; bei der Herstellung der folgenden Puffer (Tab.6) ist daher eine Kontrolle der Leitfähigkeit notwendig.

Puffer	<EDTA> <M>	<NaCl> <M>	pH	Leitfähigkeit <mS>	Bem.
A	0,1	-	7,5	14,2	-
B	0,005	-	7,5	0,79	1:20 aus A
C	0,022	-	7,5	4,4	2:9 aus A
D	0,01	0,75	5,0	60,2	-
E	0,066	-	5,0	7,53	-
F	0,01	0,3	7,5	27,5	-

Tab.6 Puffer für die Reinigung von menschlichem Clq

Alle Präparationsschritte erfolgen im Kühlraum bzw. in einer Kühlzentrifuge bei 4°C, wenn möglich auf Eis: in einem typischen Ansatz werden 500ml lipidarmes menschliches AB-Serum mit 125ml Puffer A für 15min versetzt und nach Zugabe von 4l Puffer B über Nacht gerührt. Das Präzipitat wird in 250ml-Bechern 30min bei 12000 x g (MSE, high-speed) gesammelt, mit einem Spatel abgekratzt, vereinigt, in 80ml Puffer C resuspendiert und zweimal im gleichen Puffer gewaschen (Christ, Cytofuge; 30min, 3000 x g). Das rosarote Sediment läßt man über Nacht in 10ml Puffer D leicht schütteln, um anschließend das gelöste Clq durch zweimalige Dialyse gegen 1l Puffer E wieder zu fällen.

Aus dem zweimal mit Puffer E gewaschenen Präzipitat (30min, 3000 x g) geht ein Großteil des Clq durch 16 stündiges Schütteln in 2ml Puffer F in Lösung (1. pool). Das ungelöste Material wird durch Zentrifugation abgetrennt (30min, 3000 x g) und nochmals 24h. in 2ml Puffer F geschüttelt (2. pool). Die beiden Clq-Fraktionen werden bei 100.000 x g für 15min in einer Ultrazentrifuge (TL100; Beckman, München) von restlichen, ungelösten Partikeln, Aggregaten und noch vorhandenen Lipiden gereinigt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Proteinbestimmung erfolgt nach ausreichender Dialyse gegen PBS + 0,3M NaCl im UV-Spektrophotometer ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ = 6,82; Cooper, 1985). Die Reinheit der Präparation wird durch Polyacrylamidelektrophorese abgeschätzt und beträgt ca. 90% (Fürfang, pers. Mitteilung).

II.4.3. Tritiummarkierung von Proteinen

Diese von Kummer (1986) etablierte Methode der externen Markierung mit N-Succinimidyl-<2,3- ^3H >propionat (NSP) hat gegenüber der gängigen Verwendung von ^{125}I den Vorteil der leichten Handhabbarkeit sowie der langen physikalischen und funktionellen Halbwertszeit. Im Vergleich zu einer biosynthetischen, internen Markierung mittels eines radioaktiven Aminosäure-gemisches in einer wachsenden Hybridomkultur (Fischer Lindahl, 1985) ist bei Anwendung dieser externen Kopplungsreaktion mit einer teilweisen Denaturierung des Proteins zu rechnen. Trotzdem führt diese externe Markierung zu Präparationen mit einem immunreaktiven Anteil von über 95% (Kummer, pers. Mitteilung).

Die Markierung besteht aus der elektrophilen Bindung des radioaktiven Propionsäurerestes nach Abspaltung des Succinimidylringes. Als Reaktionspartner kommen z.B. NH_2 -Reste des Proteins aber auch an OH^- -Gruppen im Wasser in Frage. Daher wird das ^3H -NSP (TRK 556, Amersham Buchler, Braunschweig) in dem apolaren Lösungsmittel Toluol aufbewahrt, das vor der Reaktion vollständig abgedampft werden muß. Die eigentliche Kopplung findet in einem Puffersystem statt, das (i) selbst nicht mit in die Reaktion einbezogen ist und (ii) einen geeigneten pH-Wert aufweist, um einerseits das $-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$ Gleichgewicht in Richtung der ungeladenen, nucleophilen Form zu verschieben - was ein alkalisches Milieu voraussetzt - andererseits aber keinen zu großen Überschuß an OH^- -Ionen bedingt. In der Praxis hat sich ein 0,1M Na-Borat/HCl-Kopplungspuffer mit einem pH zwischen 8,3 und 8,5 bewährt. Zur Stabilisierung des Proteins werden dem Puffer 0,5M NaCl für die Markierung von Antikörpern bzw. 0,3M für Clq beige setzt ist.

Die entsprechende, in Toluol gelöste Menge an ^3H -NSP (spez. Aktivität: 107Ci/mmol bzw. 3,96TBq/mmol) wird in Schritten zu 0,5ml in einem speziellen Reagenzglas durch einen Stickstoffstrom getrocknet, der so eingestellt ist, daß er die Oberfläche leicht bewegt. Das Toluol muß dabei rückstandsfrei von der Glasoberfläche abperlen, um das zu trocknende ^3H -NSP quantitativ in der Spitze des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Dazu hat sich ein konisch zulaufendes Glaszentrifugenröhrchen (ca. 1ml Volumen) mit Schliffstopfen bewährt, das nach Entfettung mit Chromschwefelsäure dreimal für 1Std. bei 100°C silikonisiert (35130, Sigma) werden muß.

Das Eindampfen ist erst beendet, wenn die flüssige Phase vollständig entfernt worden ist, da schon geringe Spuren an Toluol das später zugefügte Protein denaturieren würden. Dieser Vorgang muß gegen Ende unter einem reduzierten Stickstoffstrom durchgeführt werden, um ein Verblasen der Radioaktivität zu vermeiden.

Das zu koppelnde Protein - typischerweise zwischen 0,2 und 1mg - wird über Nacht gegen einen 1000-fachen Überschuß an Kopplungspuffer dialysiert und unmittelbar vor Gebrauch 15min bei 100.000 x g abzentrifugiert (TL100; Beckman, München). Aus dem Überstand pipettiert man nun das vorberechnete Volumen auf das trockene Kopplungsreagenz, das gut benetzt und resuspendiert werden muß; dies gilt als Start der Reaktion. Danach wird das Reaktionsgefäß mit dem Schliffdeckel verschlossen und auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach 45min Reaktionszeit wird das Kopplungsgemisch auf eine 20 x 1cm große, mit VBS 0,1% Azid äquilibrierte Bio Gel P6-DG-Säule (Bio Rad) bei einer linearen Flußrate von 15cm/h aufgetragen. Nach 24min beginnt man mit dem Sammeln der Fraktionen zu 3min (ca. 0,5ml) in Eppendorf-Tubes; bei der Radiomarkierung von Clq erfolgt dies auf Eis, wobei je 50ul inaktiviertes MNS pro Fraktion vorgelegt werden.

Je 10ul aus jeder Fraktion werden in 5ml Scinti-Gel (Roth, Karlsruhe) in einem Scintillationsspektrometer ausgewertet und entsprechend dem Verlauf der Kinetik (z.B. Fig.7) einerseits die Kopplungseffizienz abgeschätzt, andererseits die Proteinfractionen mit der größten Aktivität vereinigt. Gekoppelte Antikörper sind über Monate unter Zusatz von 2 - 10% inaktiviertem Serum bei 4°C im Kühlschrank haltbar. Markiertes Clq wird aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

Tab.7 zeigt die Parameter und die Effizienz der im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Tritiummarkierungen.

Bez.	Protein <ug>	³ H-NSP <mCi>	Ausbeute <%>	spez. Akt. <Ci/mmol>
YTS 154.7.7	400	2,0	80	640
RmT1	500	2,5	70	560
R-anti-M-Ig	400	4,0	60	960
M-anti-R-Ig	500	2,5	40	320
Clq a)	250	1,0	35	530
b)	750	0,75	60	160
c)	660	0,33	50	80

Tab.7 Markierung unterschiedlicher Proteine mit ³H-NSP

II.4.4. Radioimmunoassay (RIA)

Der Radioimmunoassay zum Nachweis zellgebundener Antikörper stellt ein im Vergleich zu einem Enzymimmunoassay aufwendiges Testsystem dar, hat aber den Vorteil, eine proportionale Beziehung zwischen der tatsächlich und der gemessenen Antikörperbindung zu gewährleisten.

Durchgeführt wird der vielseitig modifizierbare Radioimmunoassay in 96-well Rundbodenplatte (Greiner, Nürtingen). Falls nicht anders beschrieben erfolgen die Antikörperinkubationen der Zielzellen (abhängig von der Antigendichte und der spez. Markierung zwischen 100.000 und 1 Mio.) auf Eis für ca. 15 bis 45min in je 20 bis 100ul PBS bzw. VBS mit 2 bis 10% inaktiviertem Serum als Proteinquelle oder in Kulturmedium. Repetitive Pipettierschritte werden mit Eppendorf Combitips durchgeführt und die Inkubationsplatten alle 15min für 60sec geschüttelt. Am Ende jeden Versuchs bzw. zwischen den einzelnen Inkubationsschritten der indirekten Testsysteme (II.4.4.c und d) liegen je drei Waschschrte, d.h. die Mikrotiterplatten werden jeweils 5min bei 280 x g zentrifugiert und mit einem einzigen Schlag abgeklatscht, der so kräftig sein muß, daß der Inhalt einer Kavität nicht in eine andere zurückspringt. Danach wird das Zellpellet, das auch nach vielen Waschschrten nicht verloren geht, durch je einminütiges Schütteln vor und nach der Zugabe von 100ul eiskaltem Waschpuffer (PBS oder VBS mit 2% hitzeinaktiviertem FKS und 0,1% Azid) resuspendiert.

Nach dem letzten Inkubationsschritt mit den dazugehörigen Waschzentrifugationen werden die Zellen in reinem VBS oder PBS aufgenommen und mit einem 12-Kanal-Zellharvester (Hiller Co, USA) auf vorher gespülte Glasfaser-Streifen (Schleicher & Schüll) transferiert, gut nachgewaschen und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Die

Auswertung der individuellen Proben erfolgt in je 5ml Szintillationslösung (Rothizint 1100; Roth, Karlsruhe) in einem beta-Flüssigszintillationsspektrometer (Minaxi Tri-Carb 4000; Packard, Frankfurt).

a) direkter Bindungstest

Diese einfachste Variante des RIA besteht in der direkten Bindung von monoklonalen, ^3H -markierten Antikörpern bekannter Spezifität an die Zielzelle und wird in einem Inkubationsschritt durchgeführt. Der direkte Bindungsassay findet Anwendung bei folgenden Fragestellungen:

- Austestung spezifischer Marker auf Zellen bzw. Zelllinien
- Quantifizierung der Antigendichte bzw. der Antikörperbindung
- Ermittlung der notwendigen und ausreichenden Menge an radioaktiv markiertem Antikörper für den Einsatz im direkten Inhibitionsassay (II.4.4.b)

Für die letztgenannte Aufgabe wird entsprechend den späteren Versuchsbedingungen beim Inhibitionstest mit einer linearen Verdünnungsreihe des markierten Antikörpers bei konstanter Antigenmenge eine Sättigungskurve erstellt, die ein deutliches Plateau aufweisen sollte.

b) Inhibitionstest

Das Prinzip dieses Testsystems besteht in der vollständigen Absättigung aller noch verfügbaren zellständigen Antigene mit dem markierten Indikatorantikörper nach Vorinkubation mit einem unmarkierten Antikörper. Mit dieser Methode lassen sich

- Sättigungstitern von Antikörpern bekannter Spezifität bestimmen
- Aussagen über die relative Affinität treffen (Fig.1)
- Kulturüberstände nach Fusionen (II.2.9.) oder Reklonierungen (II.2.5) spezifisch austesten.

Um den Verbrauch an Radioaktivität vertretbar gering zu halten, wird für den Inhibitionsassay die geringste sinnvolle Menge des markierten Antikörpers - abgelesen an einer Sättigungskurve (II.4.4.a) - eingesetzt, um im Rahmen der experimentellen Schwankungen noch mit Sicherheit eine 100%ige Absättigung aller angebotenen Antigene zu gewährleisten.

Der markierte Antikörper sollte die unbesetzten Antigene quantifizieren, ohne zu stark in das Bindungsgleichgewicht zwischen unmarkiertem Antikörper und Antigen einzugreifen; daher ist die Inkubationsdauer bei Verwendung eines hochaviden Indikators auf 15min beschränkt. Außerdem erfolgen vor Zugabe des markierten Antikörpers keine Waschzentrifugationen, was bei niederaviden Antikörpern zu einer starken Dissoziation und damit zu falschen Aussagen führen würde.

c) indirekter Bindungstest

Bei diesem Versuchsansatz wird der nachzuweisende Antikörper durch einen ^3H -markierten "Sandwich"-Antikörper abgegriffen. Im Gegensatz zu den vorher genannten Varianten des RIA führt diese Methode zu keiner Aussage über die Bindungsspezifität des nachzuweisenden Antikörpers und nur zu einer semiquantitativen Abschätzung seines Titers. Andererseits erlaubt der Einsatz von markierten polyklonalen und monoklonalen anti-Ig Seren

- den Isotyp des Antikörpers
- die relative Antigendichte und
- die Antikörperproduktion eines definierten Klonen zu untersuchen.

Der Test erfordert zwei aufeinanderfolgende Inkubationsschritte mit drei dazwischen liegenden Waschzentrifugationen; dadurch wird ungebundener Antikörper entfernt, damit der Indikatorantikörper nicht im Überstand neutralisiert wird. Die Inkubation mit einer definierten Menge an markiertem Antiserum erfolgt in 20 μl . Für die Einstellung gilt als Faustregel, daß - Vollsättigung aller Antigene vorausgesetzt - bei gegebenem Input des Indikatorantikörpers die zellgebundene Radioaktivität sich proportional zur Anzahl der angebotenen Antigene (Zellzahl) verhält. Erfahrungsgemäß ist dies bei einem Testinput von 400.000 cpm polyklonalem M-anti-R- bzw. R-anti-M-Ig (II.1.3.a) für 200.000 Zellen näherungsweise gegeben. Die Parameter Affinität, Spezifität und Subklasse gehen jedoch so stark in das Ergebnis mit ein, daß der durch diesen Test ermittelte Titer des nachzuweisenden Antikörpers nur näherungsweise richtig ist.

Dennoch kann auch ein System bestehend aus drei aufeinanderfolgenden Antikörperreaktionen mit insgesamt neun Waschzentrifugationen immerhin noch ja/nein-Aussagen liefern. Ein solches System verwenden wir zur Isotypisierung monoklonaler Rattenantikörper, die in einem ersten Schritt an Zellen binden, in einem zweiten Schritt von subklassenspezifischen Mausantikörpern erkannt und in einem dritten Schritt durch ^3H -markiertes Ratten-anti-Maus-IgG-Serum quantifiziert werden (III.2.2). Kreuzreaktionen des polyklonalen Serums mit zellständigen Immunglobulinen sind bei Verwendung von Thymozyten zu vernachlässigen.

d) Clq-Bindungstest

Dieses Testsystem wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit etabliert, um den Clq-Uptake durch zellgebundene Antikörper zu quantifizieren. Dabei lassen sich - und das ist für spätere Überlegungen wichtig - nur solche Antikörper/Clq-Komplexe darstellen, die aufgrund ihrer Bindungsaffinität den versuchseigenen Waschprozeduren widerstehen.

Die in den Versuch eingesetzten Antikörper sind durch vorher durchgeführte Studien im Inhibitionsassay (II.4.4.b) auf Vollsättigung eingestellt worden, was bei polyklonalen Seren nur für ein bestimmtes Antigen möglich ist.

Die Zellen werden zunächst mit dem zu testenden Antikörper abgebunden; nach 15min erfolgt ohne vorhergehenden Waschschrift die Zugabe des markierten Clq. Der Ansatz

wird für weitere 45min bei Raumtemperatur in VBS mit 10% hitzeinaktiviertem MNS (III.3.) inkubiert. Anschließend wird dreimal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen.

Bei wichtigen Fragestellungen wird für jede Antigen/Antikörper-Konstellation das Bindungsverhalten mittels einer linearen Verdünnung des markierten Clq erstellt. Für die gleichzeitige Untersuchung vieler unterschiedlicher Antikörperkombinationen wird der Clq-Input vorher anhand einer solchen Sättigungskurve abgeschätzt.

II.4.5. Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Die in diesem ADCC genannten Test nachzuweisende Zytotoxizität wird gemessen mittels $\text{Na}_2(^{51}\text{Cr})\text{O}_4$, das von lebenden Zellen über einen nicht näher bekannten Mechanismus aufgenommen und von abgestorbenen Zellen wieder in den Überstand abgegeben wird. Die Versuchsanordnung richtet sich weitgehend nach den Angaben von Hale et al. (1985).

Für einen typischen Ansatz werden ca. 20 Mio. Thymozyten (II.1.4.a) in proteinfreiem, HEPES-gepuffertem MEM (041-2370; Gibco) präpariert, zweimal gewaschen und in 75ul MEM zusammen mit 25ul $\text{Na}_2(^{51}\text{Cr})\text{O}_4$ (NEZ 0-30S, 1mCi/100ul; NEN Du Pont, Dreieich) für 2h bei 37°C unter wiederholtem Schütteln inkubiert. Nicht eingebautes Chrom entfernt man durch drei Waschzentrifugationen in ca. 1ml MEM (5min, 280 x g) und stellt die Suspension auf 2 Mio. Zellen/ml ein. Davon pipettiert man mit einer Combitip-Pipette je 10ul in eine 96-well Rundbodenkulturplatte (Nunc, Wiesbaden), die vorher mit je 100ul einer sättigenden Antikörperverdünnung in HCM (II.2.2.) beschickt worden ist. Nach einer halbstündigen Inkubation im CO₂-

Begasungsbrutschrank erfolgt eine Waschzentrifugation (5min, 400 x g); der Überstand wird abgeklatscht und die Zellen in 100ul DMEM oder MEM (Gibco, Karlsruhe) mit 10% hitzeinaktiviertem MNS oder 1% Ig-freiem BSA (A 7638; Sigma, München) unter Schütteln gut resuspendiert.

Die Zugabe (einer Verdünnungsreihe) von menschlichen peripheren mononukleären Zellen (II.1.5.c) oder murinen Milzzellen (II.1.5.b) als Effektorzellen erfolgt in 100ul proteinhaltigem DMEM. Das Zellgemisch wird bei 100 x g kurz aufeinanderzentrifugiert und im Brutschrank inkubiert.

4h später werden je Kavität 100ul Überstand vorsichtig ohne Zellen abgenommen und der "Test-release" in einem Gamma-Zähler (Auto-Gamma 5230; Packard, Frankfurt) ausgewertet. Der "spezifische release" berechnet sich nach der Formel:

$$\% \text{ spez.} = (\text{Test} - \text{Spontan}) / (\text{Total} - \text{Spontan}) \times 100$$

Kavitäten ohne Effektorzellen aber mit Antikörper ergeben den "Spontan-release"; der "Total-release" bestimmt sich aus dem Input an ^{51}Cr -markierten Zellen und beträgt typischerweise um 10.000cpm. Als Kontrolle dienen Ansätze ohne Antikörper aber mit Effektorzellen.

II.5. Mathematische Modelle

II.5.1. Scatchard-Plot

Das Massenwirkungsgesetz für die einfache Reaktion zwischen Clq und Zell-gebundenem Ig lautet:

$$K = \langle \text{Clq-Ig} \rangle / \langle \text{Clq} \rangle \langle \text{Ig} \rangle.$$

Durch den Scatchard-Plot wird diese Funktion in eine Geradengleichung transformiert (Scatchard, 1949):

$$\langle \text{Clq}_{\text{geb.}} \rangle / \langle \text{Clq}_{\text{frei}} \rangle = - K \langle \text{Clq}_{\text{geb.}} \rangle + K \langle \text{Ig}_{\text{total}} \rangle.$$

Dabei gibt die Steigung der Geraden den negativen Wert der Affinitätskonstante und ihr Schnittpunkt mit der X-Achse die eingesetzte Konzentration der Bindungsstellen $\langle \text{Ig}_{\text{total}} \rangle$ an.

Alle für die Erstellung der Geradengleichung notwendigen Parameter kann man aus der Menge an eingesetzter $\langle \text{Clq}_{\text{total}} \rangle$ und der zellgebundenen $\langle \text{Clq}_{\text{geb.}} \rangle$ Radioaktivität ermitteln, wobei als Grundlage der Berechnung die Gesamtsumme an cpm eines Markierungsansatzes pro eingesetzter Proteinmenge gilt (II.4.3.).

Zur Ermittlung der Anzahl an Clq-Bindungsstellen pro Zelle wird die Konzentration des gebundenen Clq auf Moleküle pro Inkubationsvolumen bezogen und durch die Anzahl der Zellen dividiert.

Bei komplizierten, durch unterschiedliche Parameter bedingten Bindungsstudien erkennt man bei der Scatchard-Analyse zwei (oder mehrere) Graphenabschnitte. Der flache Anteil ist dabei entweder auf eine niederaffine, aber spezifische Reaktion oder auf eine unspezifische

Absorption zurückzuführen. Im Einzelfall kann man durch Kontrollversuche mit irrelevanten Antikörpern oder Zellen eine dieser beiden Interpretationen ausschließen.

Die Berechnung von zwei Regressionsgeraden für zwei unterschiedlich steile Graphenabschnitte erfolgt nach der Methode der "iterativen, gewichteten Kleinst-Quadrat-Bestimmung" mit dem Gauß-Newton Algorithmus. Dazu wird die nicht-lineare Regressionsprozedur NLIN des Statistik Software Programmpakets SAS (SAS User's Guide, 1985) benutzt. Dieses Verfahren ist auch Bestandteil des Programms "Ligand" (Munson, 1983) und dort beschrieben.

II.5.2. Abstandsberechnungen auf der Zelloberfläche

Die Oberfläche einer als kugelförmig angenommenen idealen Zelle berechnet sich mit

$$(1) \quad A = 4r^2 \times \pi.$$

Wir denken uns die Fläche als ein Quadrat mit der Seitenlänge

$$(2) \quad d = \sqrt{A}$$

Die dichteste Packung von Punkten mit gleichem Abstand (a) kann man sich als Reihen vorstellen die gegeneinander um $a/2$ verschoben sind. Der Abstand zwischen den Reihen (b) entspricht der Mittelsenkrechten eines gleichseitigen Dreiecks mit der Seitenlänge a.

Die Anzahl der Punkte in einer Reihe (x) bzw. die Anzahl der Reihen (y) ist gegeben mit

$$(3) \quad x = d/a \text{ bzw.}$$

$$(4) \quad y = d/b.$$

Die Summe aller Punkte (S) mit dem mittleren Abstand a berechnet sich nach der Formel:

$$(5) \quad S = xy;$$

durch Umformung erhält man aus (3,4,5):

$$(6) \quad S = x^2 a/b.$$

Der geometrische Zusammenhang zwischen der Mittelsenkrechten b und der Seitenlänge a eines gleichseitigen Dreiecks lautet:

$$(7) \quad b^2 = a^2 - (a/2)^2 = 0,75a^2, \text{ bzw.}$$

$$(8) \quad b = 0,87a.$$

Dies ergibt eingesetzt in (6):

$$(9) \quad x = \sqrt{0,87 S},$$

woraus sich nach (3) der mittlere Abstand mit

$$(10) \quad a = d/x = \sqrt{A/0,87 S}$$

berechnet.

III. Ergebnisse

III.1. Eigenschaften der bekannten immunsuppressiven Antikörper

III.1.1. Bindungsspezifität

Wir konnten zunächst zwei monoklonale Rattenantikörper charakterisieren, die nach in vitro Inkubation des Milz/Knochenmarkgemisches auch ohne lytisches Komplement die GvH im maximal inkompatiblen System unterdrücken (Thierfelder et al., 1985).

Beide Antikörper sind gegen das murine Theta-Antigen gerichtet, binden jedoch an unterschiedlichen Epitopen: YTS 154.7.7 erkennt eine monomorphe Determinante auf dem Theta-Antigen (Thy-1; Cobbold et al., 1983), während 30-H12 gegen eine polymorphe Struktur (Thy-1.2) gerichtet ist (Ledbetter & Herzenberg, 1979). Somit scheint es ausgeschlossen, daß die immunsuppressive Wirkung dieser Antikörper auf deren Idiotyp, d.h. auf der Bindung an ein bestimmtes Epitop beruht.

III.1.2. Avidität

Der von Cobbold et al. (1983) etablierte, immunsuppressive Antikörper (YTS 154.7.7) wurde in der Originalarbeit als niederavid beschrieben. Es war also zu prüfen,

ob diese Eigenschaft des Antikörpers für die immunsuppressive Wirkung charakteristisch ist. Daher wurde die Avidität der beiden immunsuppressiven Antikörper (YTS 154.7.7 und 30-H12) vergleichend mit dem MRC Ox7 (Thy-1.1) untersucht. Dieser Antikörper wirkt in vivo nicht immunsuppressiv (Thierfelder et al, 1985), ist jedoch hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften eingehend untersucht (Mason & Williams, 1980).

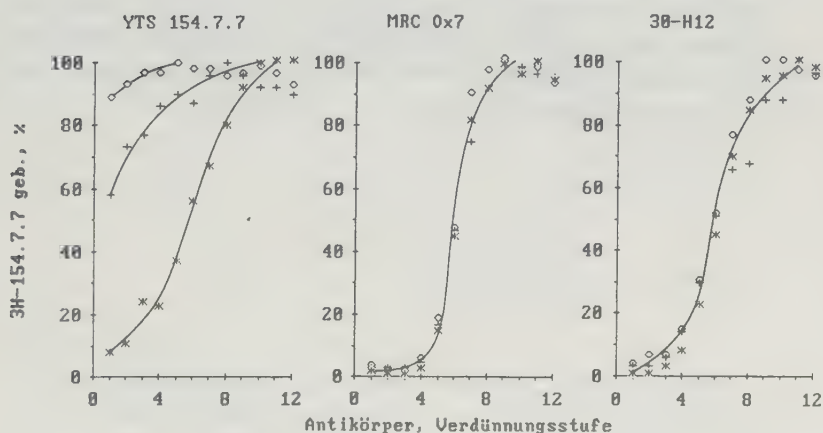


Fig.1 Inhibitions-RIA (III.4.4.b) zur vergleichenden Bestimmung der Avidität von YTS 154.7.7, 30-H12 und MRC Ox7 auf 100.000 Balb/c- bzw. AKR/J-Thymozyten: die Zellen wurden mit einem logarithmischen Verdünnung der angegebenen Antikörper inkubiert. Nach drei (*), einer (O) oder keiner (+) Waschzentrifugation erfolgte die Zugabe des ^3H -markierten Indikatorantikörpers (YTS 154.7.7). Die Inkubationen wurden auf Eis für jeweils 45min in PBS mit 2% hitzeinaktiviertem FKS durchgeführt. In Vorversuchen wurden die Antikörperpräparationen so eingestellt, daß in der 7. Verdünnungsstufe mit Halbsättigung zu rechnen war.

Dazu wurde ein Inhibitions-RIA (II.4.4.b) durchgeführt (Fig.1), bei dem vor Zugabe des markierten Indikator-antikörpers unterschiedlich viele Waschzentrifugationen eingeschoben wurden. Dabei gilt die Verschiebung der Kurvenzüge, bedingt durch die Volumenexpansion während der Waschschrirte, als Maß für die Dissoziation und damit der Avidität des Antikörpers zu dem korrespondierenden Antigen. Diese ist für die beiden beschriebenen immunsuppressiven Antikörper signifikant unterschiedlich.

Umgekehrt beschrieben Cobbold et al. (1983) aus der von ihnen etablierten Serie von anti-Theta-Antikörpern einen niederaviden R-IgG₂. (YTS 111.4.2), der in vivo unwirksam ist. Es läßt sich also kein Zusammenhang zwischen diesem physikalischen Parameter und dessen Einfluß auf die immunsuppressive Kapazität in vivo ableiten.

III.1.3. Clq-Bindung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung von Kummer (pers. Mitteilung), daß die geringe Avidität des YTS 154.7.7 durch die Anwesenheit von nativem Serum signifikant gesteigert werden kann, während für 30min bei 56°C inaktiviertes Serum diesen Effekt nicht aufweist. Ein solches Verhalten deutet auf ein hitzelabiles Protein hin und ist, z.B. für Clq beschrieben, eine Untereinheit der ersten Komponente der klassischen Komplementkaskade.

Wir versuchten daher dieses Serum-abhängige Phänomen durch gereinigtes Clq zu ersetzen und wählten dazu einen direkten Bindungs-RIA (II.4.4.a) mit ³H-markiertem YTS 154.7.7: bei konstanter Vorgabe an Antikörper und Antigen ergab sich eine Clq-abhängige Verdoppelung der gebundenen Radioaktivität (Fig.2). Dieser Effekt ist titrierbar und

auf eine deutliche Erhöhung der Avidität zurückzuführen, wie weitere Versuche entsprechend Fig.1 bestätigten (Daten sind nicht gezeigt).

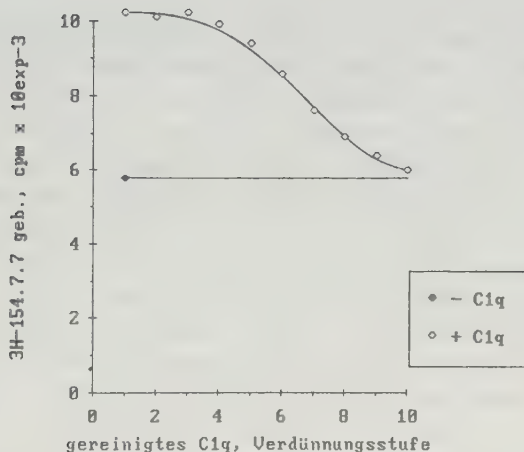


Fig.2 Einfluß von C1q auf die Bindung des YTS 154.7.7: direkter Bindungs-RIA (III.4.4.a) mit ^3H -markiertem YTS 154.7.7 auf 100.000 Balb/c-Thymozyten in PBS mit 10% inaktiviertem MNS in Anwesenheit einer logarithmischen Verdünnung von gereinigtem humanen C1q; als Kontrolle diente ein Ansatz ohne C1q.

Aufgrund der relativ hohen Avidität des 30-H12 kann in diesem indirekten System eine mögliche Interaktion des gebundenen Antikörpers mit C1q nicht aufgelöst, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Daher erschien es lohnenswert, die Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und C1q als mögliche Ursache seiner immunsuppressiven Wirkung in vivo genauer zu untersuchen. Dazu allerdings mußte ein anderes Testsystem gewählt werden, wie es in III.3. beschrieben wird.

III.2. Charakterisierung der etablierten monoklonalen Antikörper

III.2.1. Bestimmung der Spezifität

Die uns zur Verfügung stehenden Referenzantikörper wurden in den jeweiligen Originalarbeiten mittels unterschiedlicher Methoden in ihrer Spezifität charakterisiert: durch Bindung an das gereinigte Antigen (Cobbold et al., 1983), durch Inhibition der Bindung auf der Zielzelle nach Zugabe des gereinigten Antigens (Mason & Williams, 1980) bzw. durch zweidimensionale Elektrophorese. Untersuchungen von Cobbold et al. (1983) zeigten, daß alle von ihm untersuchten Thy-1 Antikörper um die Bindung am Antigen kompetieren, wobei zwei davon zwar komplett blockiert werden, selbst aber zu keiner vollständigen Inhibition eines zweiten Antikörpers der gleichen Spezifität führen; dabei handelt es sich um die in III.1. erwähnten niederaviden YTS 154.7.7 und 111.4.2.

Obwohl mittlerweile in der Literatur ein Antikörperpaar beschrieben ist, das ohne gegenseitige Inhibition auf dem Theta-Antigen binden kann (Krocze et al., 1986), ist zu erwarten, daß sich die meisten Thy-1-Antikörper bei der geringen Größe des Antigens sterisch behindern. In der Tat wird die Bindung des niederaviden ^3H -markierten YTS 145.7.7 durch alle von uns untersuchten anti-mono- und anti-polymorphen Antikörper inhibiert. Diese Eigenschaft macht ihn gut geeignet zum Einsatz bei der spezifischen Austestung von Fusionsprodukten in einem direkten Inhibitionsassay (II.4.4.b), da ein hochavider Suchantikörper die Bindung eines niederavidem Antikörpers gleicher Spezifität - besonders aus dem schwach konzentrierten Kulturüberstand einer 96-well Kulturplatte - möglicherweise nicht auflösen könnte. Fragen der

Sensitivität wurden von Siebrecht (1986) bei der Etablierung eines anti-Lyt-1 produzierenden Klonen in einem adäquaten Testsystem detailliert untersucht.

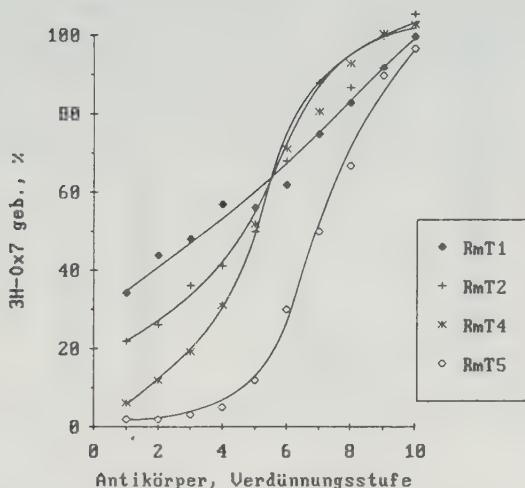


Fig.3 Inhibitions-RIA (II.4.4.b) zur Bestimmung der Bindungsspezifität: 100.000 AKR/J-Thymozyten wurden mit einer logarithmischen Verdünnung der angegebenen Antikörper aus dem Kulturüberstand inkubiert; danach erfolgte die Zugabe des ^3H -markierten Indikatorantikörpers (MRC Ox7). Die Inkubationen erfolgten auf Eis für jeweils 30min.

Mit Hilfe dieses Inhibitionsassay wurden zwei erfolgreiche Fusionen ausgetestet. Die erste erfolgte mit der nicht-produzierenden IR 938 F-Linie (Tab.2) und ergab in der ersten Austestung fünf positive Klone. Zwei davon erwiesen sich nach der ersten Reklonierung als stabil (RmT1, RmT2). Die zweite Fusion wurde mit der Kappa-produzierenden Y3 Ag1.2.3-Linie durchgeführt; unter den

ausgetesteten ca. 300 Klonen fanden wir zwei Lyt-1 (Siebrecht, 1986) und 18 Thy-1 spezifische Klone, von denen wir zwei (RmT4, RmT5) etablierten, während die anderen von der 24-well-Platte kryokonserviert wurden.

Zur weiteren Charakterisierung der Spezifität wurde ein Inhibitionsassay auf AKR/J-Thymozyten (Thy-1.1) mit ^3H -markiertem MRC Ox7 (anti-Thy-1.1) durchgeführt. Wie Fig.3 zeigt, führten alle vier Antikörper zu einer Inhibition des Indikatorantikörpers und erkennen somit keine Thy-1.2-spezifische Determinante, sondern sind gegen einen monomorphen Teil des Theta-Antigens (Thy-1) gerichtet.

III.2.2. Isotypisierung

Seit der Verfügbarkeit subklassenspezifischer monoklonaler Reagenzien hat sich deren Einsatz im Enzym- oder Radioimmunoassay zur Isotypisierung durchgesetzt gegenüber dem gängigen Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (Crowle, 1961), der hochadsorbierte polyklonale subklassenspezifische Antiseren und konzentrierte Kulturüberstände erfordert.

Wir verwendeten den in II.4.4.c beschriebenen indirekten RIA mit drei aufeinanderfolgenden Antikörperinkubationen. Bei den isotypspezifischen Antikörpern handelt es sich um "prozessierten Aszites" (Tab.5) oder um den Überstand aus einer wachsenden Hybridomkultur (Tab.3). Die käuflichen Antikörper wurden mit Waschpuffer (II.4.4) vorverdünnt, die Kulturüberstände direkt eingesetzt. Die Ergebnisse bei der Austestung der etablierten RmT-Antikörper zeigt Fig.4.

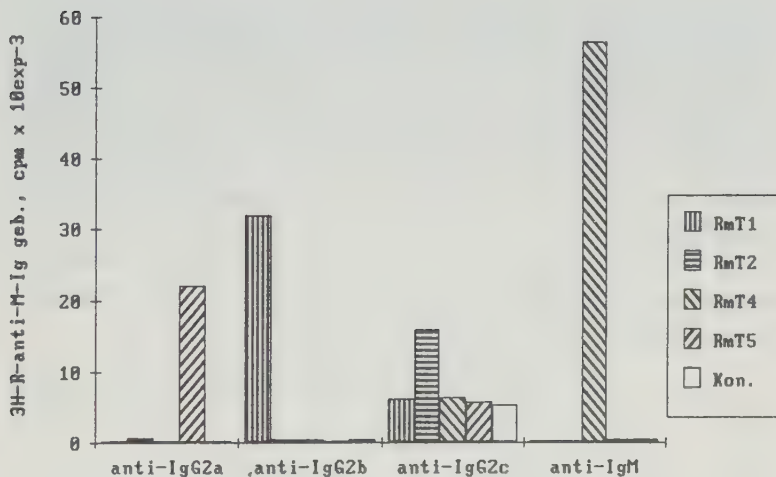


Fig. 4 Indirekter Bindungs-RIA (III.4.4.c) zur Isotypisierung der etablierten Ratten-Antikörper gegen Thy-1. Das Nachweissystem bestand aus drei aufeinanderfolgenden, 30-minütigen Inkubationen, die durch jeweils drei Waschzentrifugationen abgeschlossen werden:

- Inkubation von 500.000 CBA-Thymozyten mit den zu untersuchenden Antikörpern in 50ul Kulturüberstand;
- Inkubation mit den subklassenspezifischen monoklonalen Antikörpern in 20ul: anti-IgG_{2a} und -IgG_{2b} (Tab.3) wurden direkt als Kulturüberstand eingesetzt, anti-IgM und -IgG_{2c} (Tab.5) nach einer entsprechenden Vorverdünnung (1:500 bzw. 1:10) in VBS, 1% FKS;
- Inkubation mit ^3H -markiertem polyklonalen R-anti-M-Ig (400.000cpm in 20ul, Tab.4)

Als Kontrolle diente reines Kulturmedium ohne anti-Thy-1-Antikörper.

Durch Verwendung von Thymozyten als Zielzellen wurde eine Kreuzreaktion mit Ig-tragenden B-Lymphozyten ausgeschlossen, was sich in einem sehr niedrigen Background-Signal manifestiert. Schwierigkeiten bereiteten hingegen die Begleitproteine in den käuflichen Antikörperpräparationen, die auch nach den üblichen Waschschritten zu einer hohen unspezifischen Bindung des markierten polyklonalen Antiserums führten; durch eine hohe Verdünnung ließ sich dieses Problem minimieren (z.B. 1:500 bei Marm 4; anti-IgM). Der geringe spezifische Antikörpergehalt des Marg 2c (anti-IgG_{2c}) erlaubte jedoch nur eine 1:10-Vorverdünnung. Das daraus resultierende Signal/Hintergrund-Verhältnis von ca. 3 ist zwar sehr gering, jedoch spezifisch für RmT2, der auch in einem Enzymimmunoassay mit polyklonalem Kaninchen-anti-Ratten-IgG_{2c}-Serum eindeutig positiv reagierte (Thierfelder, pers. Mitteilung).

Somit umfaßt das von uns etablierte Spektrum monoklonaler Rattenantikörper gegen Thy-1 alle gängigen Isotypen, mit der Ausnahme von IgG₁, einer Subklasse, die bislang noch nie gegen das Theta-Antigen gefunden worden ist (Hale et al., 1985; eigene Beobachtungen).

III.3. Clq-Bindungstest

Die Überlegungen in III.1.3 führten zu der Etablierung eines Testsystems, das die Bindung von Clq quantifizieren kann. Hierzu wird in der Literatur häufig ein Radioimmunoassay mit ^{125}J -markiertem Clq beschrieben (Hughes-Jones et al., 1977). Wir wählten jedoch die Markierung mit Tritium.

III.3.1. Inkubationsbedingungen

Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war die Beobachtung, daß die Bindung von ^3H -markiertem Clq in unterschiedlichen Ansätzen - abhängig von der Wahl des Puffers und der Proteinquelle - unterschiedliche Ergebnisse erbrachte, manchmal mit einem nicht zu tolerierenden unspezifischen Anteil. Für systematische Untersuchungen wählten wir daher das indirekte System, in dem die Bindungsstabilisierung des niederaffinen YTS 154.7.7 durch das Clq-Molekül ausgenutzt wird (III.1.3.).

Fig.5 zeigt einen direkten Bindungs-RIA mit 10% aktivem MNS als Protein- und Clq-Quelle, wobei die Bindungsausbeute als ein Maß für die Verfügbarkeit von Clq stark von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums bestimmt wird. Dabei ist die optimale Situation vom Vorhandensein von Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} abhängig, wie sie im VBS-Puffer definiert vorliegen. Werden die 2-wertigen Ionen, die auch im verwendeten Serum vorhanden sind, durch EDTA komplexiert, kommt es zusätzlich zu einer starken Temperaturabhängigkeit der Antikörperbindung.

Die Bindungsausbeute von Clq ist bei 37°C in VBS am besten, ein Phänomen, das noch eingehend untersucht wurde (Fig.10 bzw. 11). Dennoch ist der quantitative Unterschied für Routineuntersuchungen nicht von Bedeutung, so daß die meisten Clq-Bindungsversuche bei Raumtemperatur durchgeführt wurden.

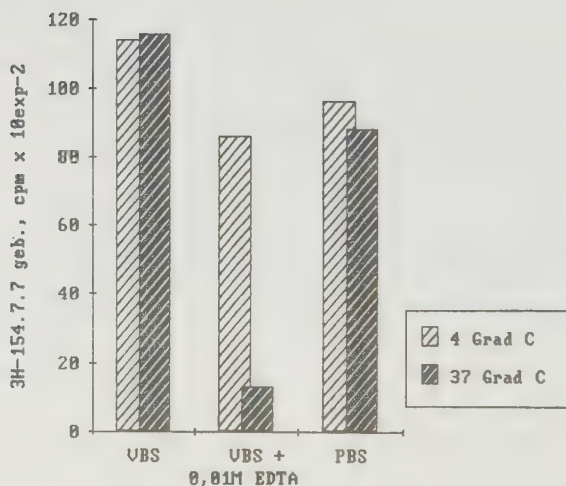


Fig.5 Direkter Bindungs-RIA (III.4.4.a) zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Puffersysteme auf die Bindung des YTS 154.7.7 durch Clq-Interaktion: 100.000 Balb/c-Thymozyten wurden in 50 µl der angegebenen Puffer bei 4°C bzw. 37°C in Anwesenheit von 10% aktivem MNS als Clq-Quelle mit einer sättigenden Konzentration von ^3H -markiertem YTS 154.7.7 inkubiert.

III.3.2. Tritium-Markierung von Clq

Im Laufe der Arbeit wurde für einige Fragestellungen eine hohe spezifische Markierung der Clq-Moleküle nötig. Obwohl dies grundsätzlich kein Problem darstellt, mußte getestet werden, ob die funktionelle Aktivität des Proteins erhalten bleibt.

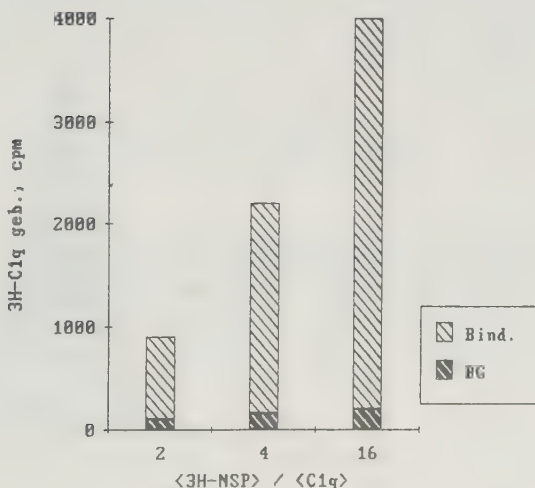


Fig.6 Radioimmunologischer Nachweis der Clq-Bindung (II.4.4.d) auf 100.000 RmT1-gesättigten Balb/c-Thymozyten mit ^3H -markiertem Clq aus drei verschiedenen Kopplungsansätzen mit den angegebenen Verhältnissen zwischen Kopplungsreagenz und Protein (Tab.7, a-c). Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängig von einander durchgeführten Experimenten zusammengestellt.

Fig.6 zeigt die Plateaubindung von ^3H -Clq aus drei unterschiedlichen Kopplungsansätzen (Tab.7, a-c) mit wachsendem molaren Verhältnis an eingesetztem ^3H -NSP zu Clq. Dabei wird deutlich, daß die absolute Ausbeute an gebundener Radioaktivität erwartungsgemäß ansteigt ohne überproportionale Zunahme des Background-Signals. Auf der anderen Seite sinkt die relative Markierung, was wohl auf die Abnahme der kopplungsfähigen Gruppen relativ zu den eingesetzten ^3H -NSP-Molekülen und damit auf deren vermehrte Hydrolyse zurückzuführen ist.

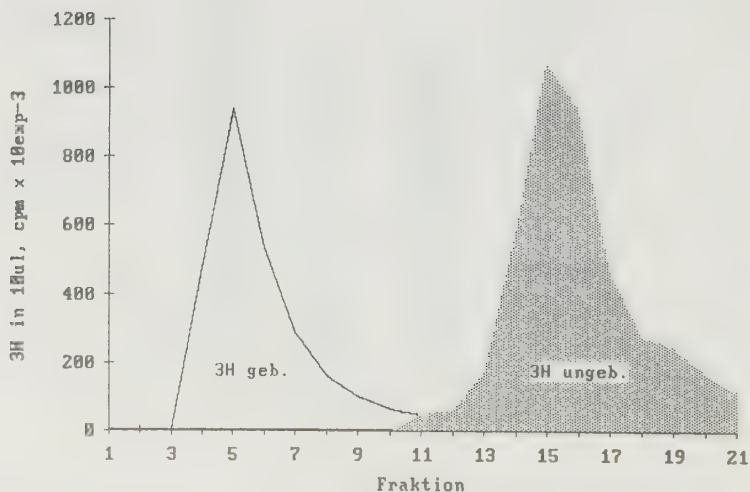


Fig.7 Trennung von gebundener und ungebundener Radioaktivität nach der Markierung von 250ug Clq mit 1,0mCi ^3H -NSP (II.4.3.): das Kopplungsgemisch wurde auf eine Entsalzungssäule (Bio Gel P6-DG) aufgetragen und mit einer linearen Flußrate von 15cm/h mit VBS, 0,1% Azid eluiert; die Fraktionen wurden nach 24min zu 3min (ca. 0,5ml) gesammelt. Je 10ul pro Fraktion wurden in einem Szintillationsspektrometer gezählt.

Die Markierungsausbeute ist in Fig.7 dargestellt als Elutionskurve nach Trennung der gebundenen von der hydrolysierten Radioaktivität durch einen Lauf über eine Entsalzungssäule (II.4.3.) aus dem Kopplungsansatz (a) in Tab.7. Das Verhältnis von proteingebundener und hydrolysierte Radioaktivität wurde als Integral unter den beiden Peaks durch Auswiegen der schraffierten Papierstücke bestimmt. Es betrug bei dem eingesetzten 15-fachen molaren Überschuß von ^3H -NSP 35%, d.h., daß bei dieser Kopplung 35% von 1,0mCi, also 0,35mCi ($=3,5\text{nmol}$) ^3H -NSP mit 250ug Clq ($=0,7\text{nmol}$) reagiert haben. Dies entspricht durchschnittlich einer Anzahl von 5 radioaktiven Propionsäureresten pro Clq-Molekül.

III.3.3. Spezifität des Testsystems

In der Literatur finden sich hauptsächlich Methoden für die Präparation von menschlichem Clq. Dies ist wohl auf die leichte Verfügbarkeit großer Serummengen zurückzuführen, die bei einer Clq-Konzentration von 100ug/ml (Cooper, 1985) benötigt werden.

Prinzipiell ist zwar bekannt, daß Clq aus unterschiedlichen Tierarten funktionell austauschbar ist (Cooper, 1985), dennoch mußte dies für unsere Präparation bestätigt werden; denn nur im positiven Fall sind die Aussagen aus unseren in vitro Untersuchungen auf die in vivo Situation im Maussystem übertragbar. Wie Fig.8 zeigt, inhibiert eine Vorinkubation mit aktivem Mausserum ebenso wie mit unmarkiertem humanen Clq die nachfolgende Bindung von markiertem menschlichem Clq auf RmT1-gesättigten Zellen, d.h. in unserem Clq-RIA (II.4.4.d) können sich humanes und murines Clq gegenseitig in der Bindung an Antikörper ersetzen.

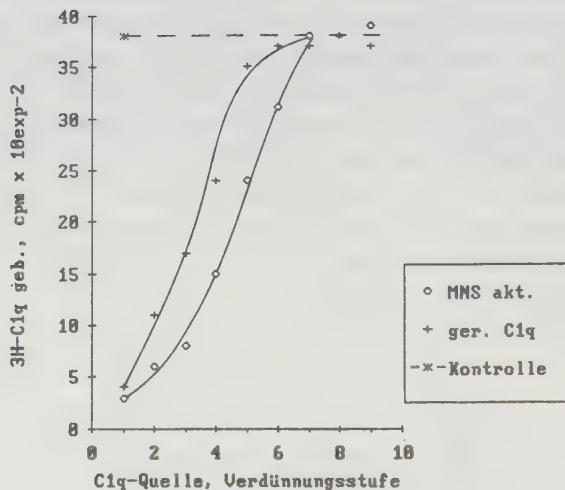


Fig. 8 Inhibition der Clq-Bindung (II.4.4.d): 500.000 RmT1-gesättigte AKR/J-Thymozyten wurden in 70ul einer logarithmischen Verdünnung der angegebenen Clq-Quellen in VBS mit 10% inaktiviertem MNS inkubiert. Nach 15min erfolgte die Zugabe einer ausreichenden Menge ³H-markiertem Clq; die Inkubationszeit dauerte 60min und wurde auf Eis durchgeführt.

III.4. Qualitative und quantitative Aspekte der C1q-Bindung

III.4.1. Subklassenabhängigkeit der C1q-Bindung

Das von uns etablierte Panel von Ratten-Antikörpern gegen Thy-1 (III.1.) eignet sich ideal zur Untersuchung der subklassenspezifischen C1q-Bindung. Die in Fig.9 dar

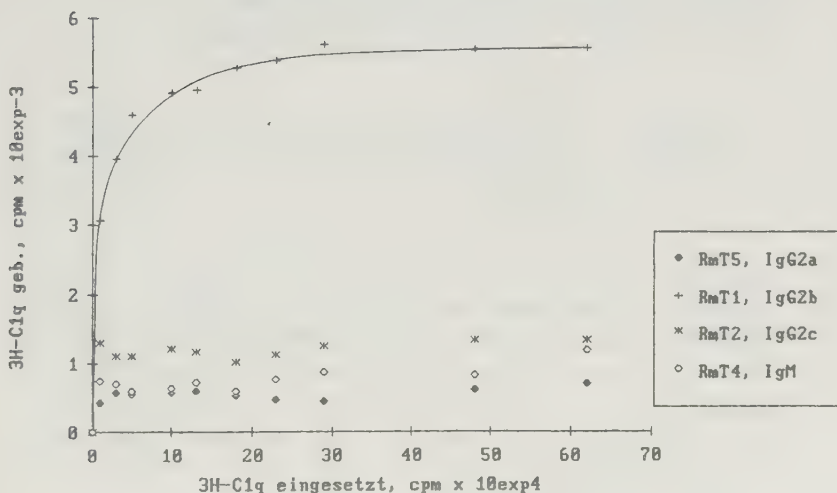


Fig.9 Radioimmunologischer Nachweis der C1q-Bindung (II.4.4.d) auf Antikörper gesättigten postthymischen T-Zellen: 1 Mio. CBA-Lymphknotenzellen wurden mit den angegebenen Antikörpern aus dem Kulturüberstand inkubiert. Nach 15min erfolgte die Zugabe einer linearen Verdünnung von ³H-markiertem C1q; die Inkubation dauerte 60min und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

gestellten Ergebnisse eines Clq-RIA auf Antikörper-besetzten Lymphknotenzellen zeigen deutlich, daß eine signifikante Clq-Fixierung nur bei Verwendung des R-IgG_{2b}-Antikörpers (RmT1) erzielt werden kann. Alle anderen Werte liegen im Background-Bereich und sind auf unspezifische Bindung zurückzuführen. Diese ist besonders bei RmT2 (IgG_{2c}) und RmT4 (IgM) relativ hoch, was wohl auf eine massive Aggregation der Lymphknotenzellen im Versuchsansatz zurückzuführen ist und bei Verwendung von Thymozyten als Zielzellen nicht auftritt (Fig.16).

Die Qualität der Clq-Bindung - zumindest bei Verwendung von Antikörpern gegen das gleiche Antigen - scheint mithin hauptsächlich durch den Isotyp des eingesetzten Antikörpers bedingt zu sein.

III.4.2. Clq-Bindung durch poly- und monoklonale

Antikörper

Um Kreuzreaktionen der polyklonalen Seren mit nicht-T-Zellen auszuschließen, wurden folgende Versuche mit Thymozyten durchgeführt. Dabei wurden folgende Kontrollen mitgeführt, die alle Background-Werte ergaben.

- AKR/J-Thymozyten inkubiert mit der Ig-Fraktion nicht immunisierter Kaninchen
- Ratten-Thymozyten inkubiert mit R-ATG
- Balb/c-Thymozyten inkubiert mit M-ATG

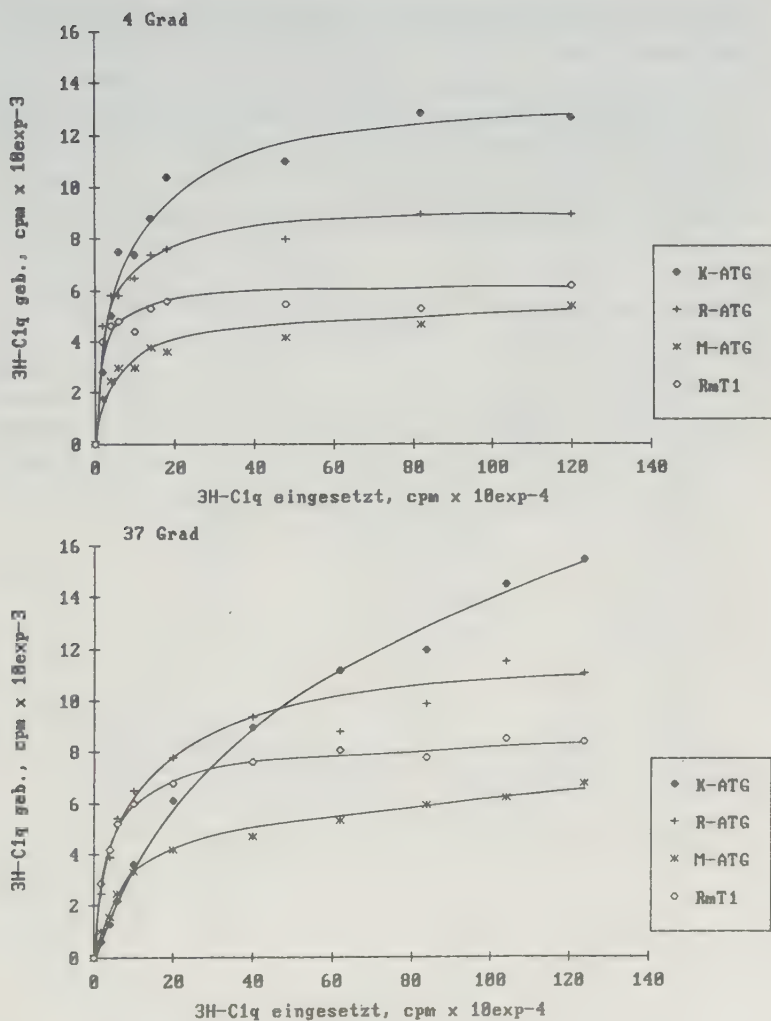


Fig.10 Radioimmunologischer Nachweis der Clq-Bindung (II.4.4.d) auf Antikörper-gesättigten Thymozyten: 500.000 AKR/J-Zellen wurden bei 4°C bzw. 37°C mit den angegebenen Antikörperpräparationen inkubiert. Nach 15min erfolgte die Zugabe einer linearen Verdünnung von ^3H -markiertem Clq. Alle Antikörperpräparationen wurden in Vorversuchen auf Theta-Vollsättigung eingestellt.

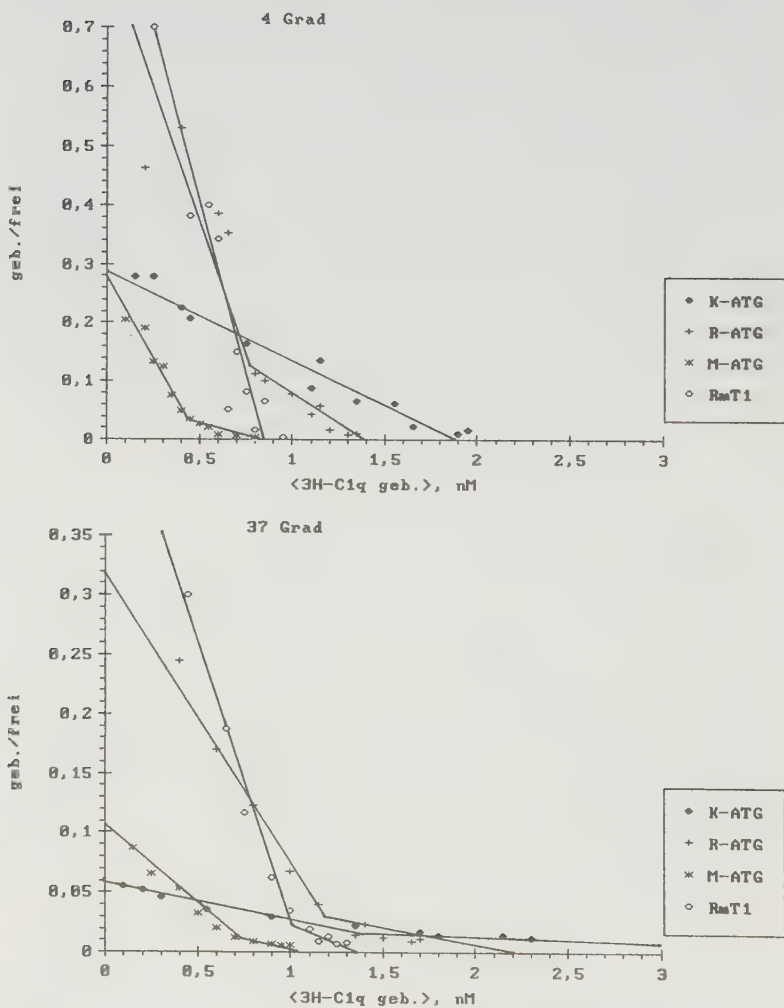


Fig.11 Scatchard-Plot der in Fig.10 dargestellten Clq-Bindung: die Berechnung der Einzelwerte und der Regressionsgeraden erfolgte nach II.5.1.

Die in Fig.10 gezeigten Bindungsdaten sind in Fig.11 als Scatchard-Plot dargestellt (II.5.1.). Bei diesem Versuch wurde ^3H -markiertes Clq aus der Markierung c) in Tab.7 eingesetzt. Dabei ergab sich eine Gesamtausbeute von 155 Mio.cpm/750ug Protein, was umgerechnet auf das Inkubationsvolumen in der Mikrotiterplatte von 80ul (Fig.10) bedeutet, daß 1cpm der Konzentration von 150fM Clq entspricht.

Die quantitativen Daten sind in Tab.8 zusammengefaßt.

Antikörper	Temp.	K $\langle M^{-1} \rangle^A$	Clq geb./Zelle ^B
K-ATG	37°C	$0,3 \times 10^8$	880.000
	4°C	$1,4 \times 10^8$	400.000
R-ATG	37°C	$2,6 \times 10^8$	450.000
	4°C	$10,0 \times 10^8$	270.000
M-ATG	37°C	$1,3 \times 10^8$	200.000
	4°C	$5,0 \times 10^8$	170.000
RmT1	37°C	$5,3 \times 10^8$	250.000
	4°C	$14,0 \times 10^8$	150.000

Tab.8 Affinitätskonstanten und Anzahl der gebundenen Clq-Moleküle auf Antikörper-gesättigten Thymozyten nach dem Scatchard-Plot in Fig.11. Die Berechnung der Parameter erfolgte nach II.5.1.

^A die angegebenen Werte entsprechen dem hochaffinen Anteil.

^B die angegebenen Werte gelten für die Gesamtausbeute.

Drei Beobachtungen sollen hier gesondert angesprochen werden:

i) Die Clq-Bindungsabweiche polyklonaler Seren ist umso größer, je weiter die phylogenetische Verwandtschaft zwischen immunisierender und immunisierter Spezies ist. Dies ist Folge der vermehrten Anzahl an Determinanten, die in dem zu immunisierenden Tier als fremde Strukturen, also als Antigene, erkannt werden. So konnten wir zeigen, daß die Seren, die für den Versuch in Fig.10 auf Vollsättigung aller Thetaantigene eingestellt wurden, die Bindung eines ^3H -markierten anti-Lyt-1 Antikörpers auf der Zielzelle unterschiedlich stark inhibierten; Vollhemmung wurde erreicht bei K-ATG bis zur dritten Titerstufe und bei R-ATG immerhin noch in der ersten Stufe, während M-ATG auch unverdünnt nur zu einer schwachen Inhibition führte (Daten sind nicht gezeigt).

ii) Fast alle Ansätze mit polyklonalen Seren zeigen einen Clq-hochaffinen und einen niederaffinen Anteil. Dies ist eher auf die Beteiligung von Antikörpern mit unterschiedlichen Clq-Affinitäten zurückzuführen als auf eine unspezifische Absorption, da die Konstante der niederaffinen Anteile durchaus im Bereich der Werte für das quantitativ gut und spezifisch bindende K-ATG liegt.

iii) Kaninchen-ATG zeigt zumindest in dieser Präparation keine hochaffine Clq-Bindung, obwohl Hughes-Jones & Gardener (1978) die Affinitätskonstante von Clq an definierte Komplexe aus Kaninchen-IgG mit $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ bestimmten. Dies läßt darauf schließen, daß auch diese Spezies eine Clq-hochaffine Subklasse aufweist. Möglicherweise ist diese in dem von uns verwendeten Kaninchen-ATG unterrepräsentiert.

III.4.3. Clq-Bindung und Antigendichte

a) Expression der Theta-Allotypen

Entsprechend früheren Beobachtungen von Hoffmann-Fezer (pers. Mitteilung) auf Gewebeschnitten postthymischer T-Zellareale konnte nachgewiesen werden, daß sich die Theta-Antigendichten auf Lymphknotenzellen von Thy-1.1- und Thy-1.2-Trägern signifikant unterscheiden. Dies gilt nicht für Thymozyten (Daten sind nicht gezeigt). Die Frage wurde in einem direkten Bindungs-RIA mit ^3H -markiertem MRC Ox7 (Thy-1.1) bzw. mit ^3H -markiertem RmT1 (Thy-1) untersucht (Fig.12).

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse mit dem antimorphen RmT1, so wird deutlich, daß Thy-1.2-Träger (Balb/c, C57BL/6) eine um den Faktor 3 bis 4 höhere Antigendichte auf postthymischen T-Zellen aufwiesen als der Thy-1.1-Träger AKR/J. Weiterhin zeigen die Bindungsdaten des MRC Ox7, der aufgrund seiner Allospezifität nur mit Thy-1.1⁺-Zellen reagieren kann, daß (Balb/c x AKR/J) F1-Tiere von beiden Eltern die halbe spezifische Antigendosis erben. Gleiche Ergebnisse erbrachte der umgekehrte Ansatz mit einem anti-Thy-1.2-Antikörper (Daten sind nicht gezeigt).

Diese quantitativen Unterschiede, die in dem summarischen RIA deutlich werden, sind auf eine Veränderung der exprimierten Antigendichte zurückzuführen und nicht auf eine veränderte Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation. So konnte Antica (pers. Mitteilung) bei Thy-1.1- und Thy-1.2-Trägern auf Einzelzellniveau annähernd gleiche Anteile an Theta⁺ Zellen in der Peripherie darstellen.

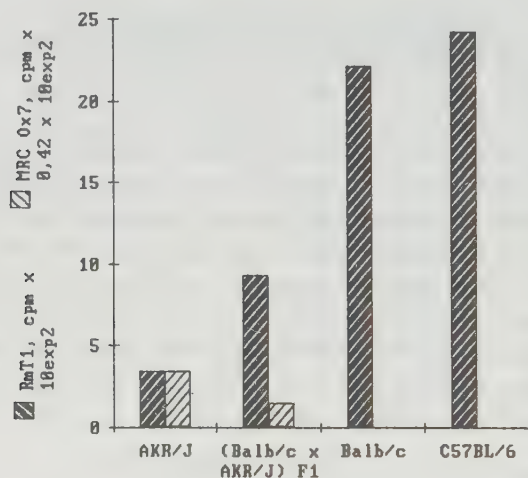


Fig.12 Radioimmunologischer Nachweis der Theta-Antigendichte: 600.000 Lymphknotenzellen der angegebenen Inzuchtstämme wurden in einem direkten Bindungs-RIA (II.4.4.a) mit einer sättigenden Konzentration von ³H-markiertem MRC O x 7 bzw. ³H-markiertem RmT1 für 30min auf Eis inkubiert. Die Werte für die Bindung der beiden (unterschiedlich markierten) Antikörper wurden an den Ergebnissen auf AKR/J-Zellen abgeglichen, was zu der angegebenen, unterschiedlichen Spreizung der Y-Achse führte.

b) C1q/IgG-Verhältnis

Als Konsequenz daraus stellte sich die Frage, ob die unterschiedliche Antigendichte quantitativ einen Einfluß auf die C1q-Bindung hat. Dazu wurde in dem in Fig.13 beschriebenen Versuch die Theta-Antigendichte dem C1q-Uptake gegenübergestellt.

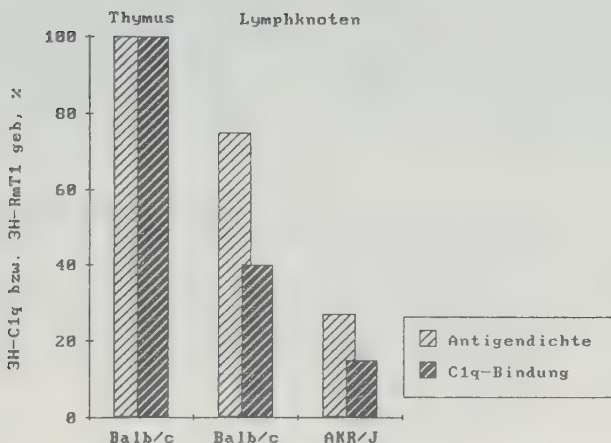


Fig.13 Radioimmunologischer Nachweis der C1q-Bindung im Vergleich zur Theta-Antigendichte auf thymischen und postthymischen T-Zellen: die Bestimmung der Antigendichte erfolgte auf 250.000 Thymozyten bzw. 500.000 peripheren Lymphozyten in einem direkten Bindungs-RIA mit ^3H -markiertem RmT1 (II.4. 4.a), die Bestimmung der C1q-Bindung auf 500.000 Thymozyten bzw. 1 Mio. peripheren Lymphozyten nach II.4.4.d. Die Ergebnisse sind auf den Anteil an Theta'-Zellen bezogen, der für die einzelnen Präparationen auf Einzelzellniveau ausgezählt wurden (Antica, pers. Mitteilung). Für Thymozyten wurde ein Wert von 100% eingesetzt.

Der exakte quantitative Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern gibt Tab.9 wieder. Für Thymozyten ergibt sich ein C1q/IgG-Verhältnis von 0,8, für Theta' periphere Lymphozyten von ca. 0,4.

Zielzelle	IgG/ Zelle	mittlerer Fc-Abstand*	C1q/ Zelle	C1q/IgG
Thymozyten	320.000 ^A	33nm	250.000 ^B	0,8
Balb/c-Lymph.	240.000 ^C	39nm	100.000 ^D	0,4
AKR/J-Lymph.	86.000 ^E	64nm	37.000 ^F	0,4

Tab.9 Experimentelle und rechnerische Bestimmung von RmTl- und C1q-Bindungsstellen auf unterschiedlichen Zielzellen.

Berechnungsgrundlagen:

* der mittlere Abstand zwischen benachbarten zellgebundenen Antikörpern berechnet sich nach II.5.2. unter der Voraussetzung, daß der Radius einer peripheren und thymischen T-Zellen im Durchschnitt 5µm beträgt.

^A Mason & Williams, 1980

^B Tab.8

^{C, D, E, F} prozentuale Umrechnung nach Fig.13.

c) C1q-Bindung an Antikörper unterschiedlicher Spezifität

Als weiterer Parameter, der die C1q-Bindung beeinflusst, könnte die Spezifität des Antikörpers, d.h. das entsprechende Antigen oder das Epitop eine Rolle spielen. Zur Klärung dieser Frage boten sich vergleichende Versuche mit folgenden R-IgG_{2b}-Antikörpern an: RmTl (Thy-1), 30-H12 (Thy-1.2) und RmL1 (Lyt-1). Lyt-1 ist ein weiteres pan-T-Zellantigen, das in der Peripherie ein ähnliches Verteilungsmuster aufweist wie Thy-1 (Ledbetter et al., 1980).

In Fig.14 ist dazu der Clq-Uptake an o.g. Antikörper dargestellt und mit deren Bindung an postthymische T-Zellen verglichen worden; dieser Versuch wurde durchgeführt in einem indirekten Bindungs-RIA (II.4.4.c) mit ^3H -markiertem M-anti-R-Ig-Serum, das die Bindung von Ratten-Antikörpern gleicher Subklasse quantifizieren kann.

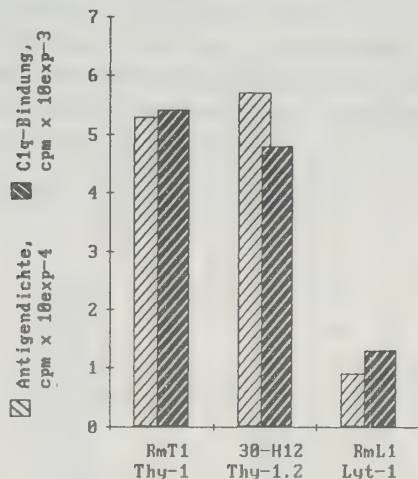


Fig.14 Radioimmunologischer Nachweis der Antikörper- und Clq-Bindung in Abhängigkeit der Antikörperspezifität: Balb/c-Lymphknotenzellen wurden mit den angegebenen Antikörpern abgesättigt; für die Bestimmung der Clq-Bindung (II.4.4.d) wurde ein Ansatz bestehend aus 1 Mio. Antikörper-gesättigten Zellen mit einer ausreichenden Menge ^3H -markiertem Clq bei Raumtemperatur für 45min inkubiert, für die Bestimmung der Antigendichte wurden 500.000 Zellen mit ^3H -markiertem M-anti-R-Ig inkubiert (II.4.4.c).

Es kann festgehalten werden, daß zumindest auf peripheren T-Lymphozyten das Verhältnis zwischen der Antigendichte und dem durch R-IgG_{2b}-Antikörper bedingtem Clq-Uptake unabhängig von der Spezifität nahezu konstant ist.

d) Addition der Clq-Bindung

Diese annähernd proportionale Beziehung zwischen Clq-Uptake und Antikörperbindung an periphere T-Zellen sollte auch für Kombinationen sich nicht inhibierender Antikörper gegen unabhängig exprimierte Antigene auf ein und derselben Zelle gelten, wie es für das Thy-1- und das Lyt-1-Antigen gilt. Dazu wurde der in Fig.15 dargestellte Versuch durchgeführt, der die Clq-Bindung auf Lymphknotenzellen, die mit RmT1 und RmL1 vorinkubiert wurden, zeigt. Es ergibt sich eine annähernde Addition der Clq-Bindung.

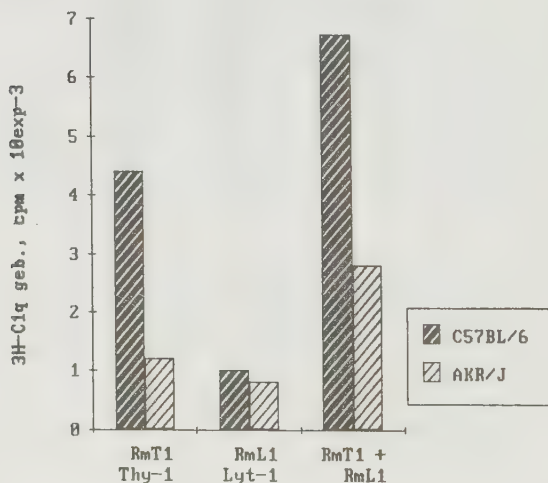


Fig.15 Radioimmunologischer Nachweis der Clq-Bindung (II.4.4.d) auf posttyhmischen Zellen: 1 Mio. Zellen verschiedener Inzuchtstämme wurden mit den angegebenen Antikörpern inkubiert; nach 15min erfolgte die Zugabe einer ausreichenden Menge an ³H-markiertem Clq. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und dauerte 60min.

III.5. Korrelation zwischen immunsuppressiver Wirkung und Clq-Bindung T-Zell-spezifischer Antikörper

III.5.1. Vergleich zwischen monoklonalen Antikörpern

a) Einfluß der Subklasse

Wir konnten in den letzten Jahren aus einer Vielzahl monoklonaler Antikörper gegen Thy-1 zunächst zwei der Subklasse Ratten-IgG_{2b} definieren, die bei serumfreier in vitro Inkubation des Milz/Knochenmarkgemisches die GvH nach histoinkompatibler Transplantation vollständig unterdrücken (Thierfelder et al., 1985).

Fig.16 zeigt einen Vergleich zwischen der mittleren Überlebenszeit beim in vivo Einsatz verschiedener monoklonaler Antikörper gegen das Theta-Antigen und deren Clq-Bindung auf Thymozyten. Daher kann man die verwendeten Antikörper entsprechend ihrem Clq-Uptake und ihrer immunsuppressiven Wirkung nach maximal histoinkompatibler Knochenmarktransplantation in zwei Kategorien einteilen:

- i) Clq-hochaffine Antikörpersubklassen, die in vivo die GvH vollständig unterdrücken und
- ii) Clq-niederaffine Antikörpersubklassen, die zumindest die chronische Mortalität der GvH nicht unterdrücken können.

Aufgrund seiner hohen Clq-Bindung konnte die in vivo Wirksamkeit eines Maus-IgG_{2a} anti-Thy-1.2 Antikörpers (63-002) voraussagt werden. Damit gehören neben R-IgG_{2b} auch M-IgG_{2a} Antikörper gegen Thy-1 zur ersten Kategorie.

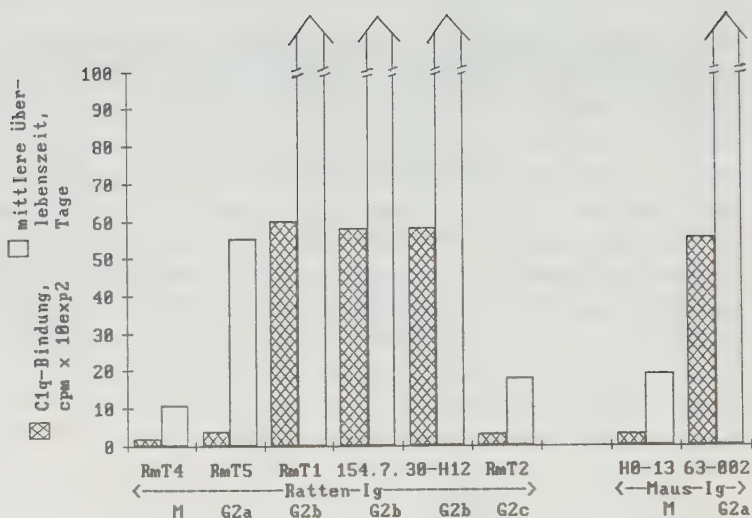


Fig.16 Radioimmunologischer Nachweis der C1q-Bindung (II.4.4.d) auf 500.000 C57BL/6-Thymozyten im Vergleich zu der mittleren Überlebenszeit der Empfängertiere (6 Mäuse pro Gruppe) nach maximal inkompatibler Knochenmark/Milzzell-Transplantation (C57BL/6→CBA) bei in vivo Behandlung mit den angegebenen Antikörpern (II.3.1.).

b) Einfluß der Antigendichte

In III.4.3. wurde gezeigt, wie die C1q-Bindung neben der Subklasse besonders auch von der Antigendichte bestimmt wird. Dabei kann die exprimierte Dichte des Theta-Antigens stammabhängig stark variieren.

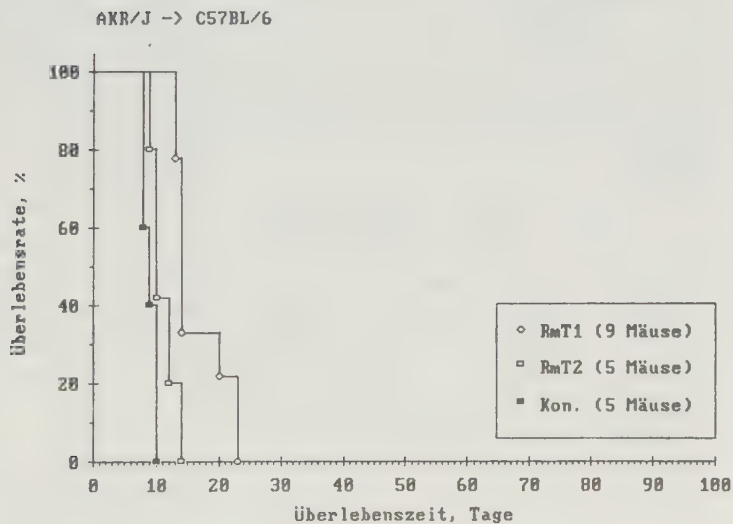
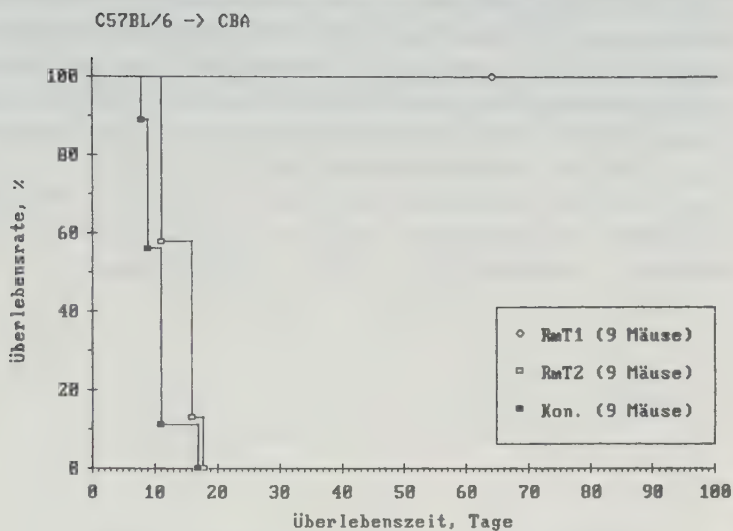


Fig.17 Überlebenszeit nach Transplantation eines Milz/Knochenmarkgemisches (II.3.1.) in den angegebenen Kombinationen bei in vivo Vorbehandlung des Empfängers mit den angegebenen Antikörpern; als Kontrolle dienten Gruppen ohne Antikörperbehandlung.

In entsprechenden Spender/Empfänger-Kombinationen untersuchten wir die GvH-Reaktion nach histoinkompatibler Milzzell/Knochenmark-Transplantation bei der Empfänger-vorbehandlung mit dem Clq-hochaffinen RmT1 und dem Clq-niederaffinen RmT2 (Fig.17). Dabei ergab sich wiederum eine positive Übereinstimmung zwischen der in vivo und der in vitro Situation insofern, als nur bei der Clq-bindenden Konstellation (RmT1 und C57BL/6) eine vollständige Unterdrückung der GvH zu beobachten war.

c) Einfluß der Antikörperspezifität

Bei der Messung des Clq-Uptake wurde deutlich, daß dieser unabhängig von der Antikörperspezifität ist (III.4.3.c). Gilt dies auch für die immunsuppressive Wirkung? Zur Klärung dieser Frage wurde eine GvH-Therapie mit RmL1 bzw. einer RmT1/RmL1-Kombination untersucht (Fig.18).

Voraussetzung für diese Versuche waren folgende Ergebnisse von Vallera et al. (1982a): eine in vitro Inkubation des Milzzell/Knochenmarkgemisches mit einem anti-Lyt-1 Antikörper und lytischem Komplement verhinderte die Mortalität nach histoinkompatibler Transplantation. Damit ist sichergestellt, daß Lyt-1 auf den die GvH verursachenden Zellen exprimiert wird.

Bei der üblichen, histoinkompatiblen Transplantation mit dem Spender C57BL/6 unterdrückt bereits RmT1 alleine die GvH vollständig (Fig.17 und RmT1-Kontrolle in Fig.18). Eine darüber hinausgehende Wirkung ist daher nur bei Verwendung von AKR/J-Mäusen als Spender zu beobachten. Der in Fig.15 gezeigte additive Effekt bei der Clq-Bindung führt in diesem System bei Kombinationstherapie

mit RmT1 und RmL1 ebenfalls zu einer Steigerung der mittleren Überlebenszeit (Fig.18). Entsprechend seinem geringen Clq-Uptake unterdrückt dabei RmL1 die GvH weder in der angegebenen Kombination AKR/J->Balb/c noch in dem üblichen Thy-1.2-System C57BL/6->CBA (RmL1-Kontrolle).

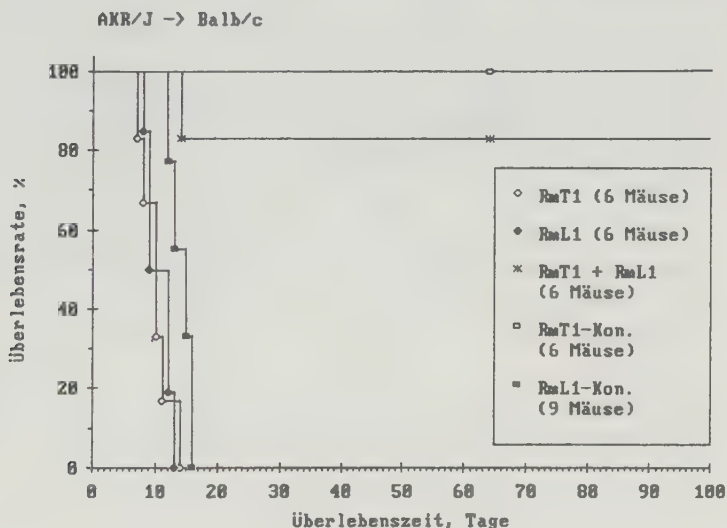


Fig.18 Überlebenszeit nach Transplantation eines Milz/Knochenmarkgemisches (II.3.1) in der angegebenen, inkompatiblen Kombination bei in vivo Vorbehandlung des Empfängers mit den angegebenen Antikörpern; als RmT1-Kontrolle diente eine Transplantation von CBA-Zellen in RmT1-vorbehandelte Balb/c-Empfänger; außerdem ist als RmL1-Kontrolle die Überlebenszeit von RmL1-vorbehandelten Empfängern in dem üblichen Transplantationsmodell (C57BL/6->CBA) dargestellt.

Im Vergleich mit den in vitro Daten aus Fig. 14 und 15 dokumentieren die in Fig.18 dargestellten Überlebenskurven eindeutig, daß nur solche Antikörper-(Kombinationen) die Mortalität nach histoinkompatibler Knochenmarkstransplantation unterdrücken, die einen gewissen, noch nicht näher definierten Schwellenwert an Clq-hochaffinem Antikörperbesatz auf der Zielzelle überschreiten.

III.5.2. Vergleich zwischen poly- und monoklonalen Antikörpern

Polyklonales Kaninchen-ATG ist das stärkste bekannte immunsuppressive Reagenz, wobei sein Einsatz in vivo bei der Knochenmarkstransplantation beschränkt bleibt, da Kreuzreaktionen mit Stammzellen fast unvermeidbar sind (siehe I.). Seine Überlegenheit gegenüber monoklonalen Antikörpern zeigt sich jedoch deutlich bei der Verzögerung der Abstoßung von Haut-Allotransplantaten, wie es in Tab.10 dargestellt ist. Dabei korreliert die Verweildauer der Transplantate mit der in Fig.10 bzw. 11 dargestellten Clq-Bindungskapazität auf peripheren T-Zellen nach Vorinkubation mit den angegebenen Antikörperpräparationen.

Die herausragende Wirkung, die Kaninchen-ATG bei der Immunsuppression einnimmt, wird besonders deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß die Transplantate bis zum Abbruch der Therapie normal anwachsen und sogar den spärlichen Haarbewuchs der Schwanzhaut entwickeln. Alle anderen Antiseren können die Abstoßung nur mehr oder weniger lang verzögern, nicht jedoch völlig verhindern.

Daneben wurde das Serum von RmT1-behandelten Mäusen aus dem in Tab.10 dargestellten Versuch, die das Transplantat gerade abgestoßen hatten, untersucht: sowohl in einem Inhibitions-RIA mit ³H-markiertem RmT1 als auch in

einem indirekten Bindungs-RIA konnte ich bindungsfähigen RmT1 im Serum nachweisen (Daten sind nicht gezeigt). Das bedeutet, daß die Abstoßung als solche in diesem Versuch nicht durch eine Neutralisation des therapeutisch eingesetzten Antikörpers durch anti-Antikörper erklärt werden kann, obwohl diese Art der Immunantwort ein häufig beschriebenes Problem bei der Serotherapie mit monoklonalen Antikörpern darstellt (siehe V).

Antikörper		Tiere pro Gruppe	mittl. Verweildauer <Tage>
Polyklonal:	K-ATG	9	>42*
	R-ATG	9	27
Monoklonal:	RmT1	7	21
	RmT2	7	16
Kontrolle:	-	9	14

Tab.10 Mittlere Verweildauer der Hauttransplantate für die inkompatible Spender/Empfänger-Kombination (C57BL/6→CBA). Der Versuch wurde durchgeführt, wie in II.3.2 beschrieben.

* Die Hauttransplantate entwickelten Haarwuchs und wurden erst nach Absetzen der Behandlung innerhalb einer Woche abgestoßen.

III.6. Zell-vermittelte Zytotoxizität in vitro

Der in II.4.5. beschriebene ADCC-Test wird in der Literatur als in vitro Korrelat eines Antikörper-abhängigen Zelleliminationsmechanismus in vivo begriffen. Daher schien die Frage sinnvoll, ob entsprechend dem Clq-RIA eine Übereinstimmung mit immunsuppressiven Antikörperfraktionen nachweisbar ist.

In einer ersten Versuchsreihe wurden menschliche Leukozyten bzw. syngene murine Milzzellen als Effektoren miteinander verglichen (Fig.19). Dabei fällt zunächst auf, daß die murinen Effektorzellen auch ohne Antikörper eine hohe ^{51}Cr -Freisetzung in den Kontrollen bedingen, die im Bereich der spezifischen Ergebnisse für ATG und über den Werten für RmT2 liegt. Ich kann mir dieses Phänomen nur als eine Interaktion der murinen Effektorzellen mit den syngen Thymozyten erklären, die als unreife Zellpopulation von peripheren Zellen in irgendeiner Weise als solche erkannt werden. Die Reduzierung der ^{51}Cr -Freisetzung durch RmT2 ist vielleicht auf dessen Neigung zu massiver Zellaggregation zurückzuführen, die im Falle der syngen Maus-Milzzellen sich auch auf mögliche Effektorzellen beziehen kann. Überhaupt muß man diesen potentiellen Einfluß der anti-T-Zell-Antikörper - besonders innerhalb des polyklonalen Serums - bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht ziehen, wie es in IV. näher diskutiert wird.

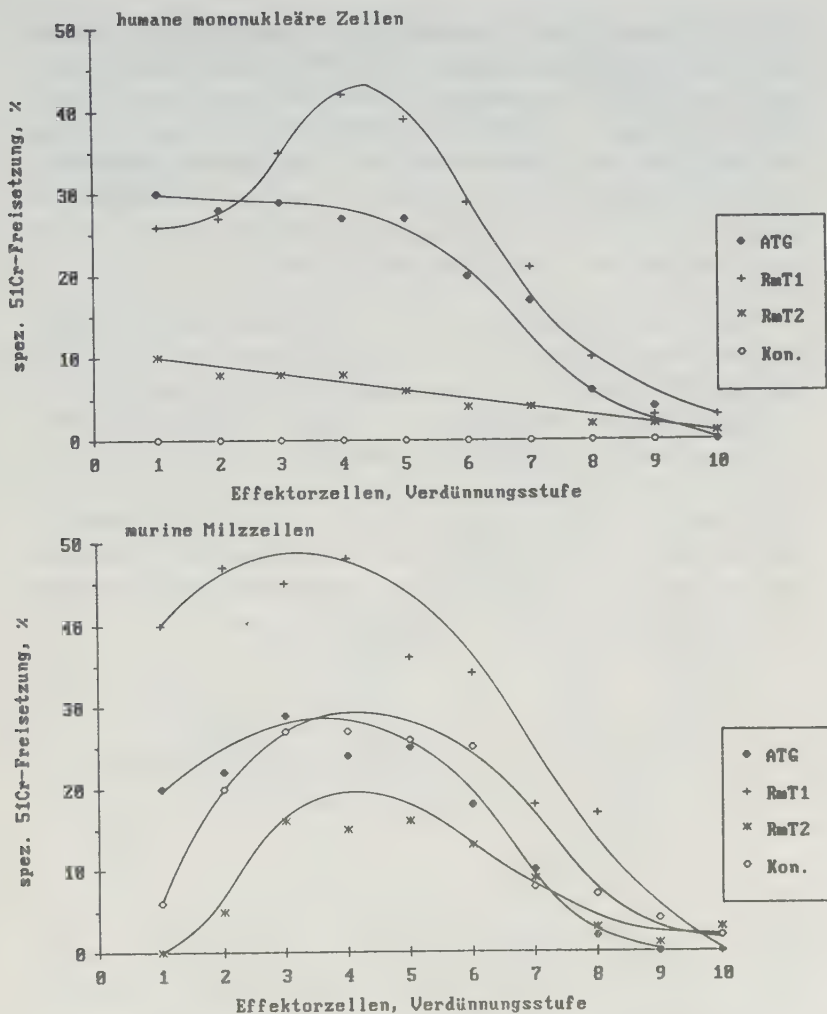


Fig. 19 ^{51}Cr -Freisetzung in einem ADCC-Test (II.4.5.) nach 4stündiger Inkubation einer konstanten Anzahl (20.000) ^{51}Cr -markierter CBA-Thymozyten mit einer logarithmischen Verdünnung der angegebenen Effektorzellen beginnend mit einem 100-fachen Überschuss. Die Zugabe der Effektorzellen erfolgte nach Vorinkubation der Zielzellen mit den angegebenen Antikörpern; die Inkubationen wurden durchgeführt in HEPES-gepuffertem MEM mit 1% Ig-freiem BSA. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Antikörper, aber mit Effektorzellen.

Die Ansätze mit menschlichen Effektorzellen zeigen eine deutlichere Abstufung in der ^{52}Cr -Freisetzung durch die verwendeten Antikörper, außerdem liegt der spezifische release der Kontrollwerte um 0%. Wesentlich ist die Tatsache, daß RmT1 in beiden Systemen die größte Effizienz aufweist und die Werte für das Kaninchen-ATG übertrifft. Diese quantitative Abstufung läuft nicht parallel mit den in vivo Daten aus Tab.10.

Die Spontan-Freisetzung bei Ansätzen ohne Effektorzellen ergab hohe, von der Antikörperpräparation abhängige Werte um 30%. Diese "spontane" Zytotoxizität war zum Teil auf den Proteinzusatz, Gammaglobulin-freies BSA, zurückzuführen. Dies zeigte deutlich ein Versuch mit nicht chromierten Zellen, deren Vitalität nach 4-stündiger Inkubation ohne Effektorzellen und ohne Antikörper in Anwesenheit unterschiedlicher Proteinquellen bestimmt wurde (Tab.11). Dabei erbrachte inaktiviertes Vollserum (FKS oder MNS) die besten Ergebnisse.

Proteinquelle	Zielzelle:	
	Thymozyten	Lymphozyten
1% BSA	80%	70%
10% MNS inakt.	100%	95%
10% FKS inakt.	98%	88%

Tab.11 Bestimmung der Vitalität der Zellen nach 4h Inkubation in DMEM mit den angegebenen Proteinzusätzen.

Fig.20 zeigt einen ADCC-Versuch, in dem inaktiviertes MNS als Proteinzusatz diente. Dabei ist deutlich, daß innerhalb des Spektrums der eingesetzten Ratten-Antikörper gegen Thy-1 nur RmT1 deutlich positiv ist. Die

"spezifische" Freisetzung bei den unwirksamen Antikörpern war gegenüber dem Spontan-Wert ohne Effektorzellen negativ. Dies kann auf eine Aufnahme von ^{51}Cr in die Effektorzellen während der gemeinsamen Inkubation zurückgeführt werden und ist entsprechend vom E/Z-Verhältnis abhängig.

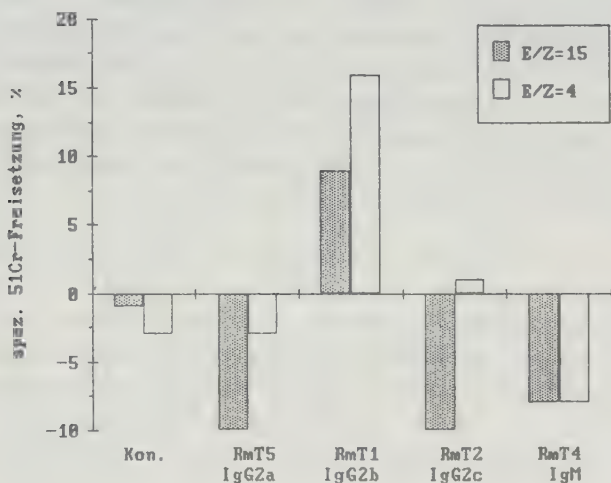


Fig. 20 ^{51}Cr -Freisetzung in einem ADCC-Test (II.4.5.) nach 4stündiger Inkubation einer konstanten Anzahl (20.000) ^{51}Cr -markierter CBA-Thymozyten mit humanen peripheren mononukleären Zellen in den angegebenen E/Z-Verhältnissen. Die Zugabe der Effektorzellen erfolgte nach Vorinkubation der Zielzellen mit den angegebenen Antikörpern; die Inkubationen wurden durchgeführt in Bicarbonat-gepuffertem DMEM mit 10% inakt. MNS. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Antikörper, aber mit Effektorzellen.

III.7. Antikörper-abhängige T-Zelleelimination in vivo

Die Versuche wurden nach der in II.3.3 beschriebenen Methode durchgeführt.

Seit Taub & Lance (1968) gilt die organspezifische Verteilung von ex vivo ^{51}Cr -markierten Zellen als Maß für die zytotoxische Wirkung von Antikörpern in vivo: eine langanhaltende Akkumulation der Radioaktivität in der Leber wird als Elimination der alterierten Zellen aus dem Kreislauf interpretiert, eine Ansammlung in der Milz als das natürliche Verhalten ungeschädigter Lymphozyten. Als Berechnungsgrundlage dient dabei der sogenannte Leber/Milz-Quotient (LMQ).

Zur prinzipiellen Etablierung des Testsystems wurde der in Fig.21 dargestellte Versuch durchgeführt: bestrahlten Mäusen wurden syngene, lebende oder durch Einfrieren abgetötete Thymozyten injiziert und die Verteilung der Radioaktivität in den Organen quantifiziert. Nach 4h hat sich der endgültige LMQ eingestellt, wobei die relativen Unterschiede in guter Übereinstimmung mit den von Taub & Lance (1968) ermittelten Werten liegen. Die zeitliche Auflösung in Fig.21 macht deutlich, daß die Zunahme der Radioaktivität in der Milz (Abnahme des LMQ!) ein langsamer Vorgang ist, verglichen mit der raschen Aufnahme der Radioaktivität in der Leber. Parallel dazu konnte ich bereits 5min nach Injektion der Zellen keine signifikante Menge an ^{51}Cr im Blut nachweisen (Daten sind nicht gezeigt).

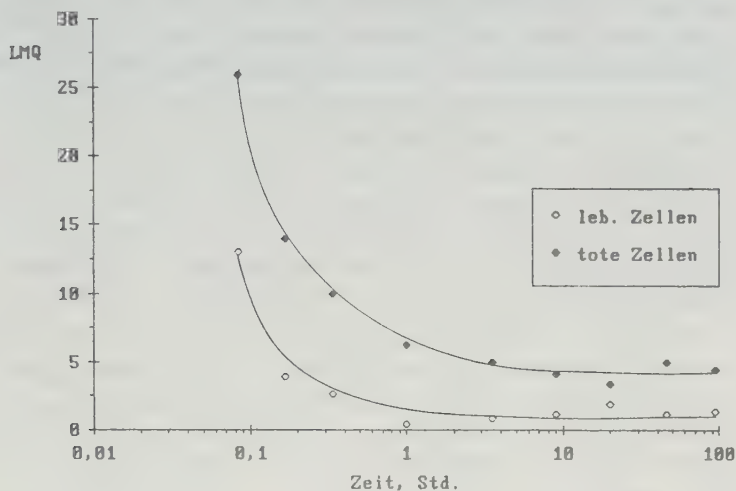


Fig.21 Verteilung der Radioaktivität in Leber und Milz (LMQ) nach einem Opsonisierungstest (II.3.3.): 10 Mio. ^{51}Cr -markierte tote oder lebendige CBA-Thymozyten (1 Mio. cpm/Maus) wurden in 24h vorher bestrahlte syngene Empfängertiere i.v. appliziert; danach wurden die Tiere der Zeitkinetik entsprechend getötet, die entsprechenden Organe entnommen und in einem Gamma-Szintillationsspektrometer ausgewertet.

Die serumfreie Inkubation von Thymozyten mit polyklonalem ATG führt zu einer Verteilung, wie sie ähnlich für abgetötete Zellen gilt (Rodd, 1979). Somit sollte es möglich sein, die spezifische Wirkung monoklonaler Antikörper in vivo zu untersuchen (Fig.22). Dies kann helfen, den empfängereigenen Effektormechanismus zu charakterisieren, der bei einer Milzzell/Knochenmark-Transplantation hilft, die GvH mittels der applizierten monoklonalen Antikörper zu unterdrücken. Daher verwendeten wir die entsprechende Vorbehandlung der Tiere, bestehend aus

einer letalen Strahlendosis von 850rad und einer einmaligen Antikörperbehandlung 24h vor der Injektion der markierten Zellen. Als Ergebnis ist deutlich zu sehen, daß RmT1 einen hohen LMQ bedingt, während die Werte von RmT2 und RmT4 intermediär zwischen den RmT1- und den Kontrollansätzen ohne Antikörper liegen (Fig.22).

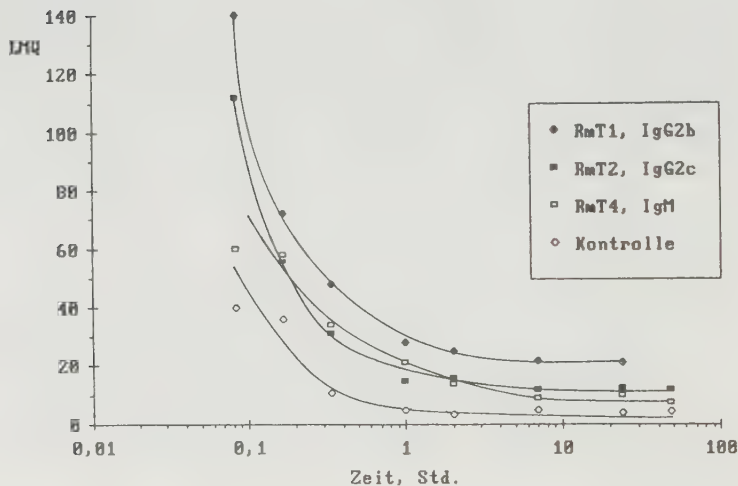


Fig.22 Verteilung der Radioaktivität in Leber und Milz (LMQ) nach einem Opsonisierungstest (II.3.3.): 12 Mio. ^{51}Cr -markierte tote oder lebendige CBA-Thymozyten (600.000cpm/Maus) wurden in 24h vorher bestrahlt und mit den angegebenen Antikörpern behandelte, syngene Empfängertiere i.v. appliziert; danach wurden die Tiere der Zeitkinetik entsprechend getötet, die entsprechenden Organe entnommen und in einem Gamma-Szintillationsspektrometer ausgewertet.

Die absoluten Werte der Radioaktivität in der Leber waren innerhalb eines Versuches, unabhängig von dem Zustand der Zellen bzw. vom Vorhandensein eines Antikörpers, nahezu konstant (Daten sind nicht gezeigt); die Veränderung des LMQ wird also hauptsächlich durch den variablen Milzwert bestimmt. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuch Gruppen von normal vorbehandelten Empfängertieren unterschiedliche Zellmengen aus ein und demselben Markierungsansatz injiziert (Tab.12). Hierbei zeigte sich deutlich, daß (i) der Leberwert - unabhängig von der Antikörperbehandlung - proportional zum Input liegt, während (ii) die Organverteilung innerhalb einer Versuchsreihe - unabhängig vom Input - von der Antikörperbehandlung bestimmt wird und in der versuchsüblichen Schwankungsbreite liegt. Der absolute Wert des LMQ ist jedoch deutlich von der individuellen Zellpräparation bzw. -markierung abhängig, was in einer unterschiedlichen Spreizung der Y-Achse in Fig.21 und 22 resultiert.

Gruppe	Input <cpm>	RmT1	1h		4h	
			Leber <cpm>	LMQ	Leber <cpm>	LMQ
I	1,5 x 10 ⁶	+	700.000	32	650.000	24
		-	680.000	12,5	500.000	10
II	0,5 x 10 ⁶	+	230.000	53	210.000	26
		-	150.000	14,5	210.000	9,6
III	0,17x 10 ⁶	+	60.000	35	80.000	25,5
		-	50.000	13	60.000	8

Tab.12 Verteilung der Radioaktivität in Leber und Milz (LMQ) nach Injektion ⁵¹Cr-markierter CBA-Thymozyten (spez. Akt.: 4 Mio. Zellen/1 Mio. cpm) in bestrahlte syngene Mäuse (zwei pro Gruppe) mit bzw. ohne RmT1-Behandlung.

IV. Diskussion

In vitro zerstören viele mono- und polyklonale anti-T-Zell-Antikörper unter Ausnutzung einer lytischen Komplementquelle ihre Zielzellen und damit deren Funktion (Lance et al., 1973; Opitz et al., 1982; Cobbold et al., 1983); eine entsprechende Behandlung eines Milzzell/Knochenmarkgemisches unterdrückt erwartungsgemäß die akute und chronische Mortalität der GvH nach Transplantation auf einen bestrahlten Empfänger (Vallera et al., 1981; Thierfelder et al., 1983).

Immunsuppressiv bezeichnen wir jedoch nur solche Antikörper, die auch bei Applikation in bestrahlte Empfänger die GvH nach histoinkompatibler Knochenmark/Milzzelltransplantation vollständig verhindern, sowie andere T-Zellfunktionen supprimieren. Letzteres gilt z.B. für die vorübergehende Unterdrückung der humoralen Immunantwort gegen Schaf-Erythrozyten, für die verzögerte Abstoßung von Haut-Allotransplantaten sowie für die eingeschränkte Stimulierbarkeit durch Phytohämagglutinin und Concanavalin A in vitro. Beschrieben ist diese Eigenschaft seit langem für anti-Thymozyten-Globulin (Lance et al., 1973), wobei schon 1967 James & Medawar zeigen konnten, daß diese Eigenschaften der 7S (IgG)-Fraktion der polyklonalen Seren zukommt. Capel et al. (1983) fanden die immunsuppressive Wirkung auf M-IgG₂-Antikörper beschränkt. Opitz et al. (1982) konnten einen monoklonalen anti-Thy-1.2 Antikörper mit den oben genannten Eigenschaften charakterisieren, der der Subklasse IgG_{2a} der Maus angehört. Entsprechendes gilt für die in der Literatur beschriebenen R-IgG_{2b}-anti-Thy-1 Antikörper (Ledbetter & Seaman, 1982; Cobbold et al., 1983) sowie für den innerhalb dieser Arbeit etablierten RmT1 (III.5.1.).

Dennoch scheint fast jeder anti-T-Zell-Antikörper in vivo eine gewisse Wirksamkeit bei der Immunsuppression aufzuweisen: so unterdrücken z.B. alle RmT-Antikörper die akute GvH im Parental-→F1 System (Thierfelder, pers. Mitteilung); bei diesem Modell mit nur einer H-2 Haplotyp-Differenz kommt es zu keiner Stimulation residuärer Empfänger-T-Zellen (HvG). Hamilton und Harris (1985) arbeiteten mit einem M-IgM-anti-Thy-1.2-Antikörper (HO-13-4) und stellten fest, daß er in speziellen, H-2-kompatiblen Transplantationskombinationen mit Minor-Differenzen in vivo bei der GvH-Suppression wirksam ist. Der gleiche Antikörper ist jedoch im maximal histoinkompatiblen System völlig unwirksam (Fig.16).

Die für die Unterdrückung der GvH notwendige T-Zell-depletion muß wohl umso umfassender sein, je größer die Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger ist; dies ist sowohl eine Frage der Anzahl an T-Zellklonen, die gegen Empfänger-eigene Antigene gerichtet sind, als auch der Dynamik ihrer Proliferation durch stark (H-2) und schwach stimulierende Antigene des Empfängers.

Tatsächlich korreliert die immunsuppressive Potenz einer Antikörperpräparation mit deren Effektivität bei der T-Zell-Elimination. So konnten Thierfelder et al. (1983) feststellen, daß eine in vivo Behandlung mit ATG zu einer völligen Zerstörung der T-Zell-Areale in der Milz führt, während ein monoklonaler IgM-Antikörper keinen signifikanten Effekt zeigte. Quantitative Daten erhoben Ledbetter & Seaman (1982), die einen Ratten-anti-Thy-1.2 Antikörper der Subklasse IgG_{2b} mit einem der Subklasse IgG_{2a} verglichen: der immunsuppressive IgG_{2b}-Antikörper führte innerhalb von 24h nach Injektion zu einer gravierenden, langanhaltenden T-Zell-Depletion in Milz und Lymphknoten, die bis zu 99% betragen kann (Seaman et al., 1983). Der IgG_{2a}-Antikörper zeigte seinen maximalen Effekt dagegen erst nach sieben Tagen, ohne die Vollständigkeit des IgG_{2b}-Antikörpers zu ergeben. Dies stimmt mit

der gegenüber RmT1 deutlich geringeren immunsuppressiven Wirkung des RmT5 (R-IgG_{2a}) überein (Fig.16).

Die besondere Stellung, die R-IgG_{2b}- und M-IgG_{2a}-Antikörper bei der Zellelimination in vivo einnehmen, beschränkt sich aber nicht nur auf T-Lymphozyten, sondern - bei entsprechender Spezifität - auch auf xeno-, allo- und syngene Tumorzellen (Ledbetter & Seaman, 1982; Herlyn & Koprowski, 1982; Thierfelder et al., 1986).

Dabei kann die unterschiedliche Effektivität der unterschiedlichen Subklassen in vivo nur zum Teil auf deren Halbwertszeit in der Zirkulation zurückgeführt werden. Dies konnten Denkers et al. (1985) mit in vitro "geswitchten" anti-Thy-1.1-Antikörpern zeigen, die sich definitionsgemäß nur im Isotyp, nicht jedoch im Idiotyp unterscheiden: dabei fiel der Serumspiegel nach einer Einzelinjektion von 100ug ¹²⁵J-markiertem Antikörper bei Verwendung der immunsuppressiven Subklasse M-IgG_{2a} in AKR/Cu Mäusen, denen ein AKR/J-Lymphom (Thy-1.1) s.c. übertragen worden war, am langsamsten ab. Wurden die Titer der unwirksamen Subklassen durch weitere Injektionen "künstlich" auf oder über diesem Niveau gehalten, erhöhte sich zwar deren in vivo Wirksamkeit bei der Elimination der Lymphomzellen, ohne jedoch die Kapazität der M-IgG_{2a} Antikörper zu erreichen.

Andere Eigenschaften als die Zirkulationsdauer müssen für die herausragende Potenz der immunsuppressiven Antikörper verantwortlich sein. So konnte in III.5. festgestellt werden, daß die immunsuppressive Wirkung einer gegebenen Antikörperpräparation mit ihrem Clq-Uptake in vitro korreliert; dieser wiederum wird neben der durch die Subklasse bedingten Affinitätskonstanten auch von der Dichte der verfügbaren Antigene auf der Zielzelle bestimmt. Der Befund alleine würde jedoch nicht ausreichen, der Clq-Bindung eine direkte funktionelle Bedeutung zuzuweisen; die charakterisierten, Clq-affinen monoklonalen Antikörper könnten noch andere Eigenschaften

besitzen, die für ihre Funktion in vivo verantwortlich sind, aber nicht in kausalem Zusammenhang mit der Clq-Bindung stehen (z.B. Bindung an Fc-Rezeptoren). Es gehört jedoch zu den wesentlichen Schlußfolgerungen aus den Versuchen mit den polyklonalen anti-T-Zell-Seren (Tab.8), daß bei der in vivo/in vitro-Korrelation nicht die Affinitätskonstante ausschlaggebend ist, sondern die absolute Anzahl an gebundenen Clq-Molekülen auf der zu eliminierenden Zelle.

Dabei muß die Antigendichte bzw. der Clq-Uptake auf jeder Zelle einen Schwellenwert überschreiten, um deren effiziente Elimination zu gewährleisten. So konnten Abehisira et al. (1981) zeigen, daß einige, funktionell definierte T_H1-Vorläuferzellen aus der Milz von AKR/J-Tieren in vitro durch Komplement-vermittelte Lyse mit anti-Thy-1.1-Antikörpern nicht eliminiert werden können, während eine entsprechende Behandlung mit Antikörpern gegen Thy-1.2 bei CBA-Mäusen diese Zellpopulation zerstören kann. Bei der Interpretation dieser Beobachtung muß man folgende Befunde berücksichtigen: die Theta-Antigendichte auf peripheren T-Lymphozyten entspricht einer Normalverteilung, was durch Einzelzelluntersuchungen mittels FACS-Analyse (Ledbetter et al., 1980) bzw. durch quantitative Autoradiographie (Antica, pers. Mitteilung) nachgewiesen wurde. Außerdem ist die summarische Theta-Antigendichte bei den Trägern der beiden Allotypen extrem unterschiedlich (III.4.3.a). Geht man davon aus, daß eine in vitro Lyse abhängig ist von der Menge an gebundenem Antikörper, so ist die Zellpopulation, bei der ein gewisser Schwellenwert unterschritten ist, bei AKR/J-Mäusen größer als bei CBA. Ein ähnlicher Schwellenwert könnte auch für einen Antikörper-abhängigen Eliminationsmechanismus in vivo gelten. Diese "resistenten" Zellen würden dann ihren Beitrag zur Entstehung einer GvH in dem gezeigten Transplantationsmodell mit AKR/J-Spenderzellen bei in vivo-Behandlung des Empfängers mit RmT1 leisten (Fig.17 und 18).

Bei (AKR/J x CBA)F1-Tieren kann die oben genannte Zellpopulation *in vitro* durch anti-Thy-1.2-Antikörper ausgemerzt werden, nicht jedoch durch Antikörper gegen Thy-1.1 (Abehisira et al., 1981). Diese funktionellen Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den quantitativen Daten aus Fig.12, die zeigen, daß F1-Tiere jeweils die halbe Antigendichte der Eltern codominant exprimieren. Somit ist bei F1-Tieren die spezifische Antigendichte für anti-Thy-1.1-Antikörper noch unterhalb des bereits unwirksamen Bereiches von AKR-Mäusen, während die Thy-1.2-Antigendichte oberhalb des Schwellenwertes für die effiziente *in vitro* Elimination zu liegen scheint. Ein ähnlicher Schwellenwert ist für Antikörper mit den entsprechenden Clq-abhängigen (?) Effektoreigenschaften *in vivo* denkbar.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von Antikörpern *in vivo* und der Clq-Bindung *in vitro* verstehen zu können, sollen im folgenden molekulare und funktionelle Aspekte dieses Proteins diskutiert werden: Clq ist die größte Untereinheit des C1-Moleküls, der ersten Komponente der klassischen Komplementkaskade. Clq stellt somit ein zentrales Bindeglied zwischen Antikörper-abhängigen humoralen und zellulären Effektormechanismen sowie dem Komplementsystem dar: C1 kann die Aktivierung des Komplementsystems bishin zum lytischen "membrane attack complex" (C5-C9) initiieren (Müller-Eberhard, 1984); dabei können Anaphylatoxine (C3a, C4a und C5a) freigesetzt (Hugli, 1984) und bestimmte Komponenten auf der Zelloberfläche deponiert werden (z.B. Clq, C3b usw.), die ihrerseits die Interaktion mit diversen Effektorzellen durch spezifische Rezeptoren ermöglichen (Schreiber, 1984).

Das native C1-Makromolekül besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten (Clq,Clr und Cls), wobei Clq die Bindung an den Fc-Teil von Antikörpern und damit die Aktivierung der katalytischen Komponente - einem Clr₂Cls₂

Tetramer - ermöglicht. Dabei ist die Bindung von C1 an den Fc-Teil "aggregierter" Antikörper, die zu einer Konformationsänderung der Clq-Untereinheit und damit zur Ausbildung neuer antigener Determinanten führt (Golan et al., 1982), keine hinreichende, wohl aber notwendige Voraussetzung für diese Aktivierung, deren Mechanismus jedoch noch nicht genau verstanden wird.

Detaillierte Untersuchungen wurden über die Bindung von Clq an den Fc-Teil von Antikörpern veröffentlicht. Clq ist ein Makromolekül von 410kD, das aus je 6 A-, B- und C-Polypeptidketten besteht. Je eine A-, B- und C-Kette bilden zusammen einen tripelhelikalen, kollagenen Arm mit einem globulären Köpfchen (Cooper, 1985). Sechs dieser Strukturen sind am N-Terminus des kollagenen Abschnittes miteinander verbunden und verleihen dem Clq-Molekül das Aussehen eines Straußes aus sechs Tulpen, wobei man sich die globulären Anteile als Blüten vorzustellen hat. Diese Köpfchen vermitteln die Bindung an die C_γ2-Domäne der Antikörper (Burton, 1985), so daß Clq theoretisch mit sechs Valenzen binden kann. Die Affinitätskonstante einer monovalenten Bindung liegt im Bereich von 10^4 bis 10^5 M⁻¹ (Hughes-Jones & Gardner, 1979). Dieser Wert ist so gering, daß eine monovalente Bindung mit ihrer kurzen Verweildauer niemals zur Aktivierung des Clr₂Cls₂-Tetramers führen kann, denn dieser Prozeß nimmt mehrere Minuten in Anspruch (Hughes-Jones et al., 1983). Die Affinitätskonstante wächst mit der Valenz der Bindung, wobei Hughes-Jones (1977) für eine zweiköpfige Bindung einen Wert von 5×10^7 M⁻¹ und einer dreiköpfigen von 10^{10} M⁻¹ bestimmte.

Dabei bestehen große subklassenspezifische Unterschiede in der Clq-Affinität. So ermittelten Schumaker et al. (1976) für menschliches IgG folgende Abstufung: IgG₃ > IgG₁ > IgG₂ >> IgG₄. Für Ratten Immunglobuline beschrieben Füst et al. (1980) mit aggregiertem Myelomprotein bei IgG_{2b}-Antikörpern den höchsten Komplement-

verbrauch. Bezogen auf die direkte Bindung von C1q konnte ich zeigen, daß innerhalb der gängigen Ratten-Subklassen R-IgG_{2b}-Antikörper die größte Affinitätskonstante zu C1q aufweisen (Fig.9); dies gilt entsprechend für IgG_{2a}-Antikörper der Maus (Fig.16).

Eine stabile, langdauernde Bindung kann aufgrund der geringen Affinitätskonstante einer monovalenten Reaktion nur dann zustande kommen, wenn das C1q-Molekül mit mindestens zwei Köpfen bindet. Dies wird ermöglicht durch eine große Flexibilität der kollagenen Arme, die sich bis zu 160° gegeneinander bewegen und somit einen Bereich von ca. 30nm überbrücken können (Knobel et al., 1975). Jedoch kann kein Winkel eingenommen werden, der kleiner als 40° ist (Schumaker et al., 1981), so daß ein C1q-Molekül nicht mit zwei Köpfchen an die symmetrischen Bindungsstellen ein und desselben IgG-Moleküls binden kann. Die Interaktion von C1q mit IgM-Antikörpern ist differenzierter zu betrachten: zwar kann das pentamere IgM-Molekül nach Bindung an benachbarte Antigene aus der planaren Form in eine "gestauchte" Konformation übergehen und mehrere C1q-Bindungsstellen präsentieren (Borsos & Rapp, 1965), jedoch ist die Affinitätskonstante wohl zu gering, um eine C1q-Bindung in unserem RIA nachweisen zu können. Entsprechend entfalten IgM-Antikörper in vitro mit lytischem Komplement eine hohe lytische Kapazität (Opitz et al., 1982; Klaus et al., 1979), ohne daß eine direkte C1q-Bindung in Testsystemen nachgewiesen werden könnte, die stringente Waschbedingungen verlangen (II.4.4.d).

Für zellgebundenes IgG bedarf es also einer Antikörperkonstellation, die innerhalb der Spannweite von C1q liegt. Dabei ist der absolute C1q-Uptake sowohl von der Antigendichte abhängig als auch von der Membranfluidität, die es erlaubt, daß die Antigen/Antikörper-Komplexe unter der quervernetzenden Bindung von C1q zu Inseln zusammenfließen. Entsprechend ist der C1q-Uptake bei 37°C höher als bei 4°C (Fig.10).

Zwei Aspekte der Clq-Bindung sollen hier eingehend diskutiert werden. Dabei handelt es sich einerseits um die Affinitätskonstante, andererseits um das Clq/IgG-Verhältnis. Beide Parameter wurden von Hughes-Jones et al., (1983, 1984) für R-IgG_{2b}-Antikörper gegen das class I-MHC-Molekül (RT1A^a) auf Rattenerythrozyten untersucht. Sie fanden eine Affinitätskonstante von $0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ und einen, von der Antigendichte unabhängigen Clq/IgG-Quotienten von 0,4. Aufgrund der angegebenen Werte für die Erythrozytenoberfläche und die Antigendichten läßt sich nach II.5.2. ein mittlerer F_c-Abstand von 100 bis 200nm berechnen. Für diesen Bereich scheint es zumindest für monoklonale Antikörper keinen Schwellenwert der Clq-Bindung zu geben, wie dies Hughes-Jones & Gosh (1981) für polyklonales anti-D Serum auf humanen Erythrozyten festgestellt haben. Der mittlere spezifische Abstand für das D-Antigen auf humanen Erythrozyten liegt zwar mit 160nm in dem oben untersuchten Rahmen, jedoch wird wohl nicht jedes Antigen von einem Clq-hochaffinen Antikörper besetzt sein, da in jeder polyklonalen IgG-Präparation auch ein mehr oder weniger großer Anteil an Clq-niederaffinen Antikörpern enthalten ist (Fig.11). So dürfte der für die Clq-Bindung wirksame F_c-Abstand deutlich größer als der durchschnittliche Antigenabstand von 160nm sein.

Eine Affinitätskonstante von $1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ und ein Clq/IgG-Verhältnis von 1 beschrieben die Autoren in den oben zitierten Arbeiten bei Verwendung eines synergistische wirkenden R-IgG_{2b}-Antikörperpaares gegen das RT1A^a-Antigen. Man versteht darunter zwei Antikörper, die auf ein und dem selben Antigen binden, ohne sich gegenseitig zu inhibieren. Ähnliche Werte veröffentlichten Bindon et al. (1987) für synergistische Antikörper gegen ein menschliches Leukozyten-Antigen.

Das in Tab.10 bestimmte Clq/IgG-Verhältnis an RmT1-gesättigte Zellen liegt für Thymozyten mit einem mittleren F_c-Abstand von 33nm bei 0,8 und für periphere T-Zellen

mit einem mittleren F_c -Abstand zwischen 40 und 65nm bei 0,4. Die Affinitätskonstante liegt für thymische T-Lymphozyten mit $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Tab.8) in der gleichen Größenordnung wie für postthymische T-Lymphozyten. Dies ergab eine Scatchard-Analyse nach Fig.9 (Daten sind nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse lassen sich nur folgendermaßen verstehen: Bei einer Antigendichte, die innerhalb der Spannweite von Clq liegt - und damit weit oberhalb des Bereichs für das $RT1A^a$ -Antigen - kommt es zu einem sprunghaften Anstieg des Clq/IgG -Quotienten, was überraschenderweise keine signifikante Veränderung der Affinitätskonstante zur Folge hat. Diese Sicht ist aber nur dann erlaubt, wenn man davon ausgeht, daß die unterschiedlichen Werte für die Clq -Affinität an anti- $RT1A^a$ -gesättigte Rattenerythrozyten ($0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$; Hughes-Jones et al., 1983) und an $RmT1$ -gesättigte T-Zellen ($5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$; Tab.9) auf systematische, testbedingte Fehler zurückzuführen sind; dies halte ich durchaus für realistisch.

Das innerhalb ihrer Versuchsanordnung signifikant höhere Clq/IgG -Verhältnis bei Verwendung synergistischer Antikörper interpretieren Hughes-Jones et al. (1984) als tetramere Zyklisierung, bei der jeweils zwei Clq -Moleküle zwischen ein Antikörperpaar interkallieren können. Voraussetzung dafür ist die Überlegung, daß die beiden Immunglobuline durch die Bindung an das gleiche Antigen eine präformierte F_c -Konstellation bieten, die innerhalb der Reichweite eines Clq -Moleküls liegt. Einfache Antikörper gegen Zelldeterminanten müssen sich dagegen erst zu Clq -bindenden Einheiten zusammenfinden. Deren Lebensdauer ist entsprechend geringer, da sie bei der statistischen Dissoziation von zwei der vier Clq - F_c -Bindungen auseinanderbricht, was bei einer monomeren Affinitätskonstanten von 10^4 M^{-1} sehr wahrscheinlich ist. Erst nach einer bestimmten Zeit kann sich daraus eine neue stabile

Konfiguration, z.B. in Form eines Tetramers bilden. Ein gewisser Prozentsatz der Fc-Teile wird daher dauernd unbesetzt sein. Dies aber bedeuten nun, daß das Clq/IgG-Verhältnis in irgendeiner mathematischen Abhängigkeit zur Antigendichte steht. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, ob es sich dabei um einen exakt definierbaren Schwellenwert handelt, oder um eine exponentielle Funktion.

Ich meine, daß die Antigendichte in der Peripherie bei einer größeren Anzahl an Theta⁺ Zellen einen Bereich unterschreitet, der für eine effektive Clq-Fixierung Voraussetzung ist, als im Thymus. Diese Theta⁺ aber Clq-Zellen könnten das summarisch bestimmte Clq/IgG-Verhältnis signifikant verändern.

Man kann jedoch davon ausgehen, daß synergistisch wirkende Antikörper eine optimale funktionelle Voraussetzung schaffen für Clq-abhängige Mechanismen. Dies konnten Bindon et al. (1985) für die Komplement-bedingte Lyse in vitro und Cobbold et al. (1986) für die in vivo Elimination zeigen. In dieser zuletzt genannten Arbeit setzten die Autoren je ein R-IgG_{2b}-Antikörperpaar gegen L3/T4 (Th_{1p}) und Lyt-2 (T_{cyt}) ein, was eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von Hautallotransplantaten bedingte. Beide Zellpopulationen zusammen umfassen zwar den größten Teil der T-Zellen, die spezifischen Antigene werden aber mit so geringer Dichte expremiert, daß bei Verwendung eines einzelnen R-IgG_{2b}-anti-L3/T4 Antikörpers (GK 1.5; Dialynas et al., 1983) praktisch keine Clq-Fixierung nachgewiesen werden konnte (Daten sind nicht gezeigt). In diesem Bereich der geringen Antigendichte könnte sich ein synergistisches Antikörperpaar besonders vorteilhaft auswirken, weil es nicht nur zu einer Verdoppelung der Clq-Bindungsstellen, sondern auch zu einer Verdoppelung des Clq/IgG-Verhältnisses, also zu einer Steigerung der Clq-Bindung um den Faktor 4 führt.

Daneben besteht noch die einfache aber ebenfalls effiziente Alternative, die Anzahl der Clq-Bindungsstellen durch den Einsatz eines Antikörpercocktails gegen unabhängig von einander expremierte Antigene zu erhöhen. Wir konnten diesen Effekt in vitro nachvollziehen (Fig.15) und seine Effizienz in vivo in einem Transplantationsmodell mit AKR/J-Spenderzellen studieren (Fig.18).

Welche Schlüsse lassen sich nun aus den oben diskutierten Bindungsdaten auf eine funktionelle Beteiligung von Clq an der Antikörper-abhängigen Zellelimination in vivo ziehen? Zunächst ist dabei an die rein humorale, Komplement-vermittelte Lyse zu denken. Zu dieser Sicht kamen Hamilton & Harris (1985), die feststellten, daß H0-13-4, ein M-IgM-anti-Thy-1.2-Antikörper (Tab.3) in verschiedenen Inzuchtstämmen nach serumfreier Antikörperinkubation eines H-2-kompatiblen Knochenmark/Milzzellgemisches die GvH unterschiedlich stark unterdrückten. Die Untersuchung der Komplementaktivität der entsprechenden Seren zeigte die gleichen stammabhängigen Unterschiede. Die Autoren interpretierten daher die Effizienz von IgM-Antikörpern in vivo als eine Komplement-abhängige Lyse. Möglicherweise kann auch die von Thierfelder (pers. Mitteilung) beobachtete Unterdrückung der akuten GvH bei einer Parental-→F1 Transplantation durch Clq-niederaffine Antikörper darauf zurückgeführt werden.

Interessanterweise läßt sich nämlich in diesem Parental-→F1-System zwar die Wirkung von RmT2 und RmT4 nicht jedoch von RmT1 durch eine Behandlung des Empfängertieres mit Cobra Venom Faktor (CoVF) aufheben. CoVF ist ein Bestandteil aus dem Gift der Kobraschlange, das als Analogon der natürlichen C3-Konvertase das gebissene bzw. behandelte Tier an C3 depletiert. C3 aber spielt für die Aktivierung des lytischen "membrane attack complex" (C5-C9) sowohl über den klassischen als auch über den alternativen Pathway die zentrale Rolle innerhalb der Komplementkaskade. Entsprechend konnte der von Hamilton &

Harris (1985) verwendete M-IgM-Antikörper bei einer H-2-kompatiblen Transplantation auf C5-defiziente DBA/2-Mäuse die GvH ^{nicht} unterdrücken. Auf der anderen Seite kann man auch bei den Komplement-defekten H-2^k-Stämmen (Tab.1) mit einer immunsuppressiven Antikörperpräparationen eine GvH sogar nach histoinkompatibler Knochenmarktransplantation verhindern. Dies konnten Onae et al. (1980) für AKR-Mäuse nach Inkubation des Knochenmarks mit Alloantisera ohne Komplement zeigen und gilt auch für CBA-Mäuse nach in vivo Behandlung mit den immunsuppressiven Antikörpern (III.5.).

Aus den Versuchen mit den genetisch determinierten oder künstlich durch CoVF bedingten Komplement-defekten Mäusen darf man folgenden Schluß ziehen: neben der Komplement-Lyse, die durchaus zur (schwachen) Wirksamkeit vieler Antikörper(subklassen) beitragen kann, müssen noch wesentlich effizientere Mechanismen postuliert werden, die für die Wirkung der oben definierten immunsuppressiven Antikörper verantwortlich sind.

Dafür kommen Zell-abhängige Effektorfunktionen in Frage, die über Rezeptoren vermittelt werden, wie sie, neben den Fc-Teilen, für eine Vielzahl von Komplementbestandteilen beschrieben sind. In der Diskussion können wir uns zunächst auf C1q-Rezeptoren beschränken, da "spätere" Komplementkomponenten, einschließlich C3 bei der in vivo Elimination von untergeordneter Bedeutung sein sollten (s.o.).

Zell-vermittelte Zytotoxizität wird in vitro mit dem ADCC-Test untersucht (III.6.). Als Effektorzellen kommen sowohl K-Zellen (Hale et al., 1985; Bernstein et al., 1980) als auch Makrophagen (Steplewski et al., 1983; Seto et al., 1983) in Frage.

In den meisten Arbeiten zeigte sich, daß Antikörper der Subklasse R-IgG_{2b} bzw. M-IgG_{2a} am effektivsten die ADCC in vitro vermitteln, während IgM-Antikörper als

völlig wirkungslos betrachtet werden können. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten aus III.6., wobei jedoch der quantitative Unterschied zwischen ATG und R-IgG_{2b}-Antikörpern bei der ADCC nicht mit deren unterschiedlichen Effizienz in vivo korrelieren (Fig.19). Die Subklassenrestriktion scheint jedoch nicht immer so eindeutig zu sein. So konnten Ralph & Nakoinz (1983) in einem ähnlichen Ansatz nicht zwischen Maus-Antikörpern unterschiedlicher IgG-Subklassen diskriminieren; auch die Daten von Hale et al. (1985) zeigen für einige R-IgG-Antikörper, die nicht zum Isotyp 2b gehören, eine signifikante ADCC.

Kann man mit dem ADCC-Test wenigstens auf die in vivo wirksame Effektorzellpopulation schließen? Über den sog. K-Zell-Typus sind die Kenntnisse noch sehr unvollständig. Immerhin konnte gezeigt werden, daß zumindest ein Teil der K-Zellen zur T-Zellreihe gehören und entsprechend bei der Maus das Theta-Antigen exprimieren (Kimball, 1986). Mithin müssten sie sich in vitro und in vivo bei Verwendung von anti-Thy-1-Antikörpern als Zielzellen selbst attackieren, was möglicherweise ~~würde~~ auch die schwer interpretierbaren ADCC-Ergebnisse mit murinen Lymphozyten als Effektorzellen in Fig.19 erklären könnte. Daher kann die ADCC mit K-Zellen meiner Meinung nach nicht als sinnvolles in vitro-Korrelat für einen Antikörper-abhängigen zellulären zytotoxischen Mechanismus in vivo dienen.

So kommen also an erster Stelle Makrophagen als Effektorzellen in Frage. Tatsächlich entwickeln die bei der Lymphozyten-Präparation anfallenden adhärennten Zellen nach längerer Kultivierung in vitro eine Antikörper-abhängige, zytotoxische Aktivität (Steplewski et al., 1983). Parallel dazu konnte in vivo die Mitwirkung von Makrophagen am Antikörper-induzierten Abstoßungsprozeß xenogener Tumore durch histologische Untersuchungen nachgewiesen werden (Adams et al., 1984). Zudem läßt sich die depletorische Wirkung von monoklonalen Antikörpern durch

Absättigung der Makrophagen mittels einer Injektion von Silikapartikeln aufheben; mit dieser Behandlung werden Makrophagen "überfüttert" und so vorübergehend außer Funktion gesetzt (Opitz et al., 1982).

Oben wurde bereits die Möglichkeit einer Mitwirkung von C1q bzw. C1 an diesen zellulären Prozessen via spezifischer Rezeptoren angedeutet und tatsächlich konnten Tenner & Cooper (1981) u.a. auch auf menschlichen Monozyten/Makrophagen C1q-Rezeptoren nachweisen. Die C1q-Rezeptor-vermittelte Interaktion zwischen Effektor- und Antikörper-besetzten Zielzelle als Voraussetzung einer Phagozytose durch Monozyten konnte von Sorvillo et al. (1986) in vitro klar bestätigt werden. In einem ähnlichen Ansatz von Bobak et al. (1987) wurde der Einfluß von C1q durch Anheftung an eine Matrix getrennt von der Wirkung der Antikörper auf den Zielzellen studiert. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß bei (der Induktion) der Phagozytose ein kooperativer Effekt zwischen C1q- und Fc-Rezeptoren abläuft. Sorvillo et al. (1986) konnten zudem zeigen, daß diese Interaktion durch das ubiquitäre Glycoprotein Fibronektin verstärkt wird, dem allgemein eine wichtige Rolle bei der Zelladhärenz und -interaktion zukommt (Hynes, 1986). In unserem Zusammenhang ist die Beobachtung von Bedeutung, daß Fibronektin mit C1q - nicht jedoch mit C1 - reagiert (Pearlstein et al., 1982), ohne mit der Bindung des C1q-Rezeptors zu konkurrieren (Tenner & Cooper, 1980).

Es ist auf jeden Fall evident, daß eine Interaktion zwischen Ziel- und Effektorzelle sowohl von der Anzahl der "Brückenglieder" als auch von deren Stabilität abhängig ist. Auf dieser Ebene ergibt sich also eine sinnvolle Korrelation zwischen einer Makrophagen-bedingten Zytotoxizität und einer stabilen C1q-Bindung auf Antikörper-besetzte Zielzellen, wie sie für immunsuppressive Antikörperpräparationen beschrieben wurde (III.4.).

Als bevorzugter Ort der Makrophagentätigkeit bei der Elimination von Antikörper-besetzten Lymphozyten aus der Zirkulation kommt das Retikuloendothelialsystem (RES) in Frage. So konnte Martin (1969) autoradiographisch zeigen, daß die nach Antiserenbehandlung in der Leber angesammelten, ^3H -Uridin markierten Thymozyten von den Kupfferschen Zellen, einem Teil des RES, phagozytiert werden. Entsprechend konnten Opitz et al. (1982) nach Applikation ihres immunsuppressiven M-IgG_{2a}-anti-Thy-1.2-Antikörpers in normale Mäuse eine kurzfristige Absättigung der Kapazität des RES-Filters feststellen.

Experimente mit ^{51}Cr -markierten Lymphozyten nach syn- oder allogener Transplantation machten deutlich, daß besonders die Verteilung der Radioaktivität zwischen Leber und Milz bei der Interpretation der immunologischen Wirkmechanismen eine Rolle spielt. Unbehandelte Zellen führen zu einer starken Anreicherung in der Milz, während tote oder in vitro mit Antiseren inkubierte Zellen das Gleichgewicht stark zu Gunsten der Leber verschieben (Rodd, 1979, Taub & Lance, 1968). Dabei führten die wenigen in der Milz auftretenden ^{51}Cr -markierten Zellen nach einer weiteren Transplantation auf einen syngeneten Empfänger zu einer Milz/Leber-Verteilung, wie es einer unbehandelten Kontrollgruppe entspricht (Martin, 1969).

In III.7. wurde für den immunsuppressiven RmT1 ein LMQ gefunden, wie es für ATG beschrieben ist, so daß die für polyklonale Seren gewonnenen Erkenntnisse auf die in vivo Applikation immunsuppressiver monoklonaler Antikörper übertragen werden dürfen. Dabei wurde wiederum deutlich, daß auch andere Antikörper gegen Thy-1 durchaus bei der Zellelimination in vivo wirksam sind, ohne jedoch die depletorische Kapazität des C1q-bindenden RmT1 zu erreichen (Fig.22). Diesbezüglich steht noch eine Untersuchung von anderen R-IgG_{2b}-Antikörpern (z.B. RmL1) aus.

Der Prozeß des Ansammelns der Radioaktivität in der Leber verläuft sehr rasch, wie die zeitliche Auflösung in Fig.21 und 22 beweist. Man darf also annehmen, daß die Zellen bereits bei der ersten Passage durch die Leber abgefangen werden. Von dort wandern funktionell ungeschädigte Zellen in die Milz oder andere periphere lymphatische Organe, während geschädigte Zellen vom RES eliminiert werden. Dieses Phänomen kann durch Blockade der Makrophagen nach einer Injektion von Silikapartikeln teilweise unterbunden werden (Rodt, 1979).

Obwohl der Zusammenhang zwischen C1q-Uptake und Immunsuppression eine funktionell noch nicht klar definiert ist, kann der in dieser Arbeit beschriebene C1q-RIA als in vitro Testsystem eine Voraussage der in vivo Wirksamkeit einer gegebenen Antikörperpräparation geben. In der Aussagekraft und in der Handhabung ist er anderen Systemen, z.B. der ADCC, überlegen.

V. Ausblick

Die immunsuppressive Therapie mit monoklonalen Antikörpern ist in der Klinik bereits im Versuchsstadium, z.B. bei der HLA-identischen Knochenmarktransplantation durch in vitro Inkubation mit lytischem Komplement (Prentice et al., 1984; Herve et al., 1985). Auch in vivo werden monoklonale Antikörper bei Abstoßungskrisen nach Organtransplantationen eingesetzt (Ortho, 1985). Die berichteten Erfolge sind unterschiedlich gut, aber in jedem Fall ermutigend.

Unsere Erfahrung aus dem Mausmodell berechtigen zu der Hoffnung, die in vivo Applikation monoklonaler Antikörper bei der Unterdrückung der GvH auch auf den Menschen übertragen zu können. Das Ziel dabei sollte die Knochenmarktransplantation auch zwischen nicht näher miteinander Verwandten sein.

Der in vivo Einsatz hat dabei einen wesentlichen Vorteil gegenüber einer in vitro Behandlung, nämlich die zusätzliche Unterdrückung der HvG; dies kann eine verminderte Abstoßungsrate zur Folge haben, bzw. zu einer Reduzierung der für die Konditionierung des Empfängers erforderlichen Strahlendosis beitragen. Der letztgenannte Gesichtspunkt konnte von uns bereits in dem üblichen histoinkompatiblen Mausmodell verifiziert werden (Thierfelder et al., 1986).

Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie beim Menschen ist eine T-Zell-spezifische Antikörperpräparation, die in dem von uns etablierten Clq-RIA eine signifikante Menge Clq bindet. Die gesuchten monoklonalen Antikörper sollten der Subklasse M-IgG_{2a} oder R-IgG_{2b} angehören. Falls die Antigendichte, die neben dem Isotyp ein entscheidendes Kriterium für die Clq-Bindung dar-

stellt, zu gering ist, besteht die Möglichkeit, synergistisch wirkende Antikörperpaare zu etablieren, wie dies Bindon et al. (1985) für ein Leukozyten-Antigen beim Menschen dargestellt haben, oder auf additive Antikörperkombinationen zurückzugreifen, deren Wirkung Granger et al. (1982) bei der in vitro Behandlung von menschlichem Knochenmark untersucht haben.

Dennoch ist nicht zu erwarten, daß ein solches optimales Antikörperpaar auch Abstoßungserscheinungen nach Organtransplantationen wirkungsvoll und langdauernd unterdrücken kann, da bereits nach wenigen Behandlungen ein hoher Titer an anti-Antikörpern im Serum gebildet wird, der zu einer völligen Neutralisation des therapeutischen Antikörpers führt. Das wurde im Tiermodell (Benjamin et al., 1986) beobachtet und stellt auch beim Menschen ein bekanntes Risiko dar (Jaffers et al., 1986). Diese anti-iso- und anti-idiotypische Antwort könnte durch den Einsatz eines zweiten, parallel wirkenden Antikörpercocktails einer anderen immunsuppressiven Subklasse gegen ein anderes Antigen bzw. anderes Epitop oder aber durch (gentechnisch hergestellte) menschliche Antikörper umgangen werden; der Spielraum hierfür allerdings ist recht klein.

Die Zukunft der Organtransplantation liegt daher wohl in der Induktion einer Empfängertoleranz gegen Spendergewebe durch eine begleitende Knochenmarktransplantation. Diese nämlich sollte, wenn man die Erfahrungen aus der experimentellen Forschung für den klinischen Bereich umsetzt, mittels spezifisch wirkender monoklonaler Antikörper beherrschbar sein.

VI. Zusammenfassung

1) Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Radioimmunoassay mit ^3H -markiertem humanen Clq etabliert, mit dessen Hilfe es gelang, Clq -hoch- und niederaffine Antikörper(kombinationen) zu definieren. Die Clq -Bindung ist dabei abhängig von der Menge an angebotenen Bindungsstellen (Antigendichte) und der Affinitätskonstante.

2) Die Clq -Affinitätskonstante für R-IgG_{2b} -Antikörper gegen das Theta-Antigen auf Thymozyten wurde bei 37°C mit ca. $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ bestimmt; ähnliche Werte ergaben sich für M-IgG_{2a} -Antikörper.

3) Das Verhältnis zwischen Clq - und IgG -Bindung ist für den weiten Bereich der unterschiedlichen Antigendichten, den das Theta-Antigen auf peripheren T-Zellen verschiedener Inzuchtstämme überstreicht, nahezu konstant. Wird jedoch ein gewisser Schwellenwert überschritten, der es ermöglicht, daß benachbarte Fc -Teile auf der Zelle innerhalb der 30nm -Spannweite von Clq liegen, kommt es zu einer sprunghaften Verdoppelung des Clq/IgG -Verhältnisses. Dies gilt für das Theta-Antigen auf Thymozyten, und entspricht in diesem Punkt der Wirkung synergistischer Antikörperpaare.

4) Es zeigte sich, daß die in vitro bestimmte Clq-Bindung einer gegebenen Antikörperpräparation gegen T-Zellen mit deren immunsuppressiven Wirkung in vivo korreliert; dabei unterdrücken monoklonale Antikörper einer Clq-hochaffine Subklasse gegen stark exprimierte T-Zellantigene (z.B. RmT1 bei Thy-1.2-Spendern) bereits bei einer einmaligen Empfängerbehandlung die akute und chronische Mortalität der GvH nach Transplantation eines maximal histoinkompatiblen Knochenmark/Milzzellgemisches völlig. Polyklonales K-ATG, das den höchsten gemessenen Clq-Uptake zeigt, führt sogar zu einer sehr deutlichen Verzögerung der Abstoßung von Hautallotransplantaten.

5) Der dieser Immunsuppression zugrunde liegende Mechanismus besteht in einer Elimination der Antikörperbesetzten, immunkompetenten T-Zellen durch empfangereigene Monozyten/Makrophagen, die wahrscheinlich durch spezifische Rezeptoren für gebundenes Clq und/oder den Fc-Teil der Antikörper vermittelt wird.

VII. Literaturverzeichnis

- Abehisira, O., Edwards, A. und Simpson, E. (1981) Eur. J. Immunol. 11, 275; Functional and binding activity of monoclonal anti-Thy-1 antibodies: evidence for different expression of the two alleles.
- Adams, D.O., Hall, T., Steplewski, Z. und Koprowski, H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3506; Tumors undergoing rejection induced by monoclonal antibodies of the IgG2a isotyp contain increased numbers of macrophages activated for a distinctive form of antibody-dependent cytotoxicity.
- Bazin, H. (1982) Prot. Biol. Fluids 29, 615; Production of rat monoclonal antibodies with the Lou rat non secreting IR 983F myeloma cell line.
- Bazin, H. und Malache, J-M. (1986) J. Immunol. Meth. 88, 19; Rat (and mouse) monoclonal antibodies. V. A simple automated technique of antigen purification by immunoaffinity chromatography.
- Bekkum, D.W. van, und De Vries, M.J. (1967) Radiation Chimaeras. Logos Press, London
- Benjamin, R.J., Cobbold, S.P., Clark, M.R. und Waldmann, H. (1986) J. exp. Med. 163, 1539; Tolerance to rat monoclonal antibodies.
- Bernstein, I.D., Nowinski, R.C., Tam, M.R., McMaster, B., Houston, L.L. und Clark, E.A. (1980) Monoclonal antibody therapy of mouse leukemia. In: Monoclonal antibodies: A new dimension in biological analyses, (Herausgeb.: Kennet, R.H., McKearn, T.J. und Bechtol, K.B.) Plenum, New York; 275
- Bindon, C.L., Hale, G., Clark, M. und Waldmann, H. (1985) Transplantation 40, 538; Therapeutic potential of monoclonal antibodies to the leucocyte-common antigen. Synergy and interference in complement-mediated lysis.
- Bindon, C.L., Hale, G., Hughes-jones, N., Gorick, B. und Waldmann, H. (1987) Molec. Immunol. 24, 587; Synergistic complement lysis by monoclonal antibodies to the human leukocyte common antigen requires both the classical and the alternative pathway.

- Blankenhorn, E.P. und Douglas, T.C. (1972) J. Hered. 63, 259; Location of the gene for theta antigen in the mouse.
- Bobak, D.A., Gaither, T.A., Frank, M.M. und Tenner, A.J. (1987) J. Immunol. 138, 1150; Modulation of FcR function by complement: subcomponent C1q enhances the phagocytosis of IgG-opsonized targets by human monocytes and culture-derived macrophages.
- Borsos, T. und Rapp, H.J. (1965) Science 150, 505; Complement fixation on cell surfaces by 19S und 7S antibodies.
- Boyum, A. (1968) Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 1; Separation of leucocytes from blood and bone marrow. With special reference to factors which influence and modify sedimentation properties of hematopoietic cells.
- Burton, D.R. (1985) Molec. Immunol. 22, 161; Immunoglobulin G: functional sites.
- Campbell, D.G., Williams, A.F., Bayley, P.M. und Reid, K.B.M. (1979) Nature 282, 341; Structural similarities between Thy-1 antigens from rat brain and immunoglobulin.
- Capel, P.J.A., van Rijs, J.H. und Koene, R.A.P. (1983) Transplant. Proc. 15, 608; Subclass dependent immunosuppression of antilymphocyte globulin.
- Cobbold, S.P., Thierfelder, S. und Waldmann, H. (1983) Mol. Biol. Med. 1, 285; Immunosuppression with monoclonal antibodies. A model to determine the rules for effective serotherapie.
- Cobbold, S.P., Martin, G., Qin, S. und Waldman, H. (1986) Nature, 323, 164; Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance,.
- Cooper, N.R. (1985) The classical complement pathway: Activation and regulation of the first complement component. In: Advances in Immunology (Herausgeb.: Dixon, F.J.) Academic Press, New York, 151.
- Cotmore, S.F., Crowhurst, S.A. und Waterfield, M.D. (1981) Eur. J. Immunol. 11, 597; Purification of Thy-1-related glycoproteins from human brain and fibroblasts: Comparison between these molecules and murine glycoproteins carrying the Thy-1.1 and Thy-1.2 antigens.
- Crowle, A.J. (1961) Immunodiffusion. Academic Press, New York.

- Dalchau, R. und Fabre, J.W. (1979) *J. exp. Med.* 149, 576; Identification and unusual tissue distribution of the canine and human homologous of Thy-1.
- Denkers, E.Y., Badger, C.C., Ledbetter, J.A. and Birnstein, J.D. (1985) *J. Immunol.* 135, 2183; Influence of antibody isotype on passive serotherapy of lymphoma.
- Dialynas, D.P., Wilde, D.B., Marrack, P., Pierres, A., Wall, K.A., Harrau, W. et al. (1983) *Immunol. Rev.* 74, 30; Charakterization of the murine antigenic determinant designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK 1.5: Expression of L3T4 by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity.
- Douglas, T.C. (1972) *J. exp. Med.* 136, 1055; Occurrence of a Theta-like antigen in rats.
- Fazekas, de, St., Groth, S. und Scheidegger, D. (1980) *J. Immunol. Meth.* 35, 1; Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics.
- Filipovich, A.H., Youle, R.J. Neville, D.M., Vallera, D.A., Quinones, R.R. and Kersey, J.H. (1984) *Lancet* 1, 469; Ex-vivo treatment of donor bone marrow with anti-T-cell immunotoxins for prevention of graft-versus-host disease.
- Fischer Lindahl, K. (1985) Tissue typing using biosynthetically labeled monoclonal antibodies. In: *Immunological Methods III* (Herausgeb.: Lefkovits, J. und Pernis, B.) Academic Press, New York, 217.
- Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W.H. und Loutit, J.F. (1956) *Nature* 177, 452; Cytological identification of radiation chimaeras.
- Fürfang, J. und Thierfelder, S. (1986) *J. Immunol. Meth.* 91, 123; Effective avidin coating of erythrocytes by disulfide bond formation. Production of a stable rosetting agent for multiple applications.
- Füst, G., Medgyesi, G.A., Bazin, H. und Gergeley, J. (1980) *Immunol. Lett.* 1, 249; Differences in the ability of rat IgG subclasses to consume complement in homologous and heterologous serum.
- Galfre, G., Howe, S.C. und Milstein, C. (1977) *Nature* 266, 550; Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines.
- Galfre, G., Milstein, C. und Wright, B. (1978) *Nature* 277, 131; Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-FD portion of mouse IgG.

- Golan, M.D., Burger, R. und Loos, M. (1982) J. Immunol. 129, 445; Conformational changes in Clq after binding to immune complexes: Detection of neoantigens with monoclonal antibodies.
- Goldschneider, J., Komschlies, K.L. und Greiner, D.L. (1986) J. Exp. Med. 163, 1; Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I: Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors.
- Granger, S. Janassy, G., Francis, G., Blacklock, H., Poulter, L.W. und Hoffbrand, A.V. (1982) Brit. J. Haematol. 50, 367; Elimination of lymphocytes from bone marrow with monoclonal T-antibodies and cytolytic complement.
- Groth, C.G. (1981) Transplant. Proc. 13, 460; The value of ALG and ATG in clinical renal transplantation - recent european experience.
- Gunter, K.C., Malek, T.R. und Sherach, E.M. (1984) J. exp. Med. 159, 716; T cell-activation properties of an anti-Thy-1 monoclonal antibody.
- Hale, G., Clark, M. und Waldmann, H. (1985) J. Immunol. 134, 3056; Therapeutic potential of rat monoclonal antibodies: Isotype specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity with human lymphocytes.
- Hamilton, B.L. und Harris, D. (1985) Transplantation 40, 90; Prevention of graft-versus-host disease using antibodies to Thy-1.
- Herlyn, D. und Koprowski, H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4761; IgG2a monoclonal antibodies inhibit human tumor growth through interaction with effector cells.
- Herve, P., Flesch, M., Cahn, J.Y., Racadot, E., Plouvier, E., Lamy, B., Rozenbaum, A., Noir, A., Leconte des Floris, R. und Peters, A. (1985) Transplantation 39, 138; Removal of marrow T cells with OKT3-OKT11 monoclonal antibodies and complement to prevent acute graft-versus-host disease.
- Heyworth, M.F. (1982) Immunological. Rev. 65, 79; Clinical experience with antilymphocyte serum.
- Hoessi, D., Brou, C. und Pink, J.R.C. (1980) Nature 283, 576; T-lymphocyte differentiation is accompanied by increase in salic acid content of Thy-1 antigen.
- Hunt, S.A. und Stinson, E.B. (1981) Annu. Rev. Med. 32, 213; Cardiac transplantation.

- Hughes-Jones, N.C. (1977) Immunol. 32, 191; Functional affinity constants of the reaction between ^{125}J -labelled C1q and C1q binders and their use in the measurement of plasma C1q concentration.
- Hughes-Jones, N.C. und Gardner, B. (1978) Immunol. 34, 459; The reaction between the complement subcomponent C1q, IgG complexes and polyionic molecules.
- Hughes-Jones, N.C. und Gardner, B. (1979) Molec. Immunol. 16, 697; Reaction between the isolated globular subunit of the complement component C1q and IgG-complexes.
- Hughes-Jones, N.C. und Ghosh, S. (1981) FEBS Lett. 126, 318; Anti-D-coated Rh-positive red cells will bind the first component of the complement pathway, C1q.
- Hughes-Jones, N.C., Gorick, B.D. und Howard, J.C. (1983) Eur. J. Immunol. 13, 635; The mechanism of synergistic complement-mediated lysis of rat red cells by monoclonal IgG antibodies.
- Hughes-Jones, N.C., Gorick, B.D., Miller, N.G.A. und Howard, J.C. (1984) Eur. J. Immunol. 14, 974; IgG pair formation on one antigenic molecule is the main mechanism of synergy between antibodies in complement mediated lysis.
- Hugli, T.E. (1984) Springer Semin. Immunopathol. 7, 193; Structure and function of the anaphylatoxins.
- Hynes, R.O. (1986) Spektrum der Wissenschaft 8, 80; Fibronektine.
- Jaffers, G.J. Fuller, T.C., Cosimi, A.B., Russell, P.S., Winn, H.J. und Colvin, R.B. (1986) Transplantation 41, 572; Monoclonal antibody therapy. Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intense immunosuppression.
- James, K. und Medawar, P.B. (1967) Nature 214, 1052; Characterization of antilymphocytic antibody.
- Kadish, J.L. und Wenc, K.M. (1983) Hybridoma 2, 87; Contamination of polyethylene glycol with aldehydes: Implications for hybridoma fusion.
- Kimball, J.W. (1986) Introduction to Immunologie; Macmillan Publishing Company, New-York.
- Klaus, G.G., Pepys, M.B., Kitajima, K. und Ashonas, B.A. (1979) Immunol. 39, 687; Activation of mouse complement by different classes of mouse antibodies.

- Knobel, R., Villiger, W. und Isliker, H. (1975) Eur. J. Immunol. 5, 78; Chemical analysis and electron microscopy studies of human Clq prepared by different methods.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975) Nature 256, 495; Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
- Kolb, H.J., Rieder, I., Rodt, H., Netzel, B., Grosse-Wilde, H., Scholz, S., Schäffer, E., Kolb, H. und Thierfelder, S. (1979) Transplantation 27, 242; Anti-lymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with adsorbed antithymocyte globulin.
- Korngold, R. und Sprent, J. (1978) J. Exp. Med. 148, 1687; Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histoincompatibility barriers in mice.
- Kroczeck, R.A., Gunter, K.C., Seligmann, B. und Shevach, E.M. (1986) J. Immunol. 136, 4379; Induction of T cell activation by monoclonal anti-Thy-1 antibodies.
- Kuchel, P.W., Campbell, D.G., Barday, A.N. und Williams, A.F. (1978) Biochem. J. 169, 411; Molecular weights of the Thy-1. Glycoproteins from rat thymus and brain in the presence and absence of deoxycholate.
- Kummer, U., Mysliwietz, J., Gutensohn, W., Buschette, S., Jahn, H., Neuser, D. und Munker, R. (1984) Immunobiol. 166, 203; Development and properties of a monoclonal antibody specific for human ecto-5-nucleotidase.
- Kummer, U. (1986) Tritium radiolabeling of antibodies to high specific activity with N-succinimidyl <math>[2,3-^3\text{H}] propionate: Use in detecting and analysing monoclonal antibodies. In: Methods in Enzymology 121, 670 (Herausgeb.: Langone, J.L. und van Vunakis, H.) Academic Press, New York.
- Kurnick, J.T., Österberg, L., Stegagno, M., Kimura, A.K., Örn, A. und Sjöberg, O. (1979) Scand. J. Immunol. 10, 563; A rapid method for separation of functional lymphoid cell population of human and animal origin on PVP-silica (Percoll) density gradients.
- Lance, E.M., Medawar, P. und Taub, R.N. (1973) Anti-lymphocyte serum. In: Advances in Immunology 17, 1 (Herausgeb.: Dixon, F.J. und Kunkel, H.G.)
- Ledbetter, J.A. und Herzenberg, L.A. (1979) Immunol. Rev. 47, 64; Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens.

- Ledbetter, J.A., Rouse, R.V., Micklem, H.S. und Herzenberg, L.A. (1980) J. Exp. Med 152, 280; T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens.
- Ledbetter, J.A. und Seaman, W.E. (1982) Immunol. Rev. 68, 197; The Lyt-2, Lyt-3 macromolecules: Structural and functional studies.
- Ledney, G. und van Bekkum, D.W. (1969) J. Nat. Cancer Inst. 42, 633; Secondary disease in irradiated mice grafted with allogeneic bone marrow from antithymocytic serum treated donors.
- Littlefield, J.W. (1964) Science 145, 709; Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and there presumed recombinants.
- Lorenz, E., Uphoff, D.E., Reid T.R. and Scheldon, E. (1951) J. Nat. Cancer Inst. 12, 197; Modification of irradiation injury in mice and ginea pigs by bone marrow injections.
- Marshak-Rothstein, A., Fink, P., Gridley, T., Ranlet, D.H. Bevan, M.L. und Gefter, M.C. (1979) J. Immunol. 122, 2491; Properties and application of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus.
- Martin, W.J. (1969) J. Immunol. 103, 979; Assay for the immunosuppressive capacity of antilymphocyte serum. I. Evidence for opsonization.
- Mason, D.W. und Williams, A.F. (1980) Biochem. J. 187, 1; The kinetics of antibody binding to mambrane antigens in solution and at the surface.
- Mathe, G. (1968) Bone marrow transplantation. In: Human Transplantation, 284 (Herausg.: Rapaport, F.T. und Dausset, J.) Grune & Stratton, New York.
- McKenzie, J.L. und Fabre, J.W. (1981a) Transplantation 31, 275; Studies with a monoclonal antibody on the distribution of Thy-1 in lymphoid and extracellular connective tissues of the dog.
- McKenzie, J.L. und Fabre, J.W. (1981b) J. Immunol. 126, 843; Human Thy-1: unusual localization and possible functional significance in lymphoid tissues.
- Meurer, S.C., Hodgdon, J.C., Hussey, R.E., Protentis, J.P., Schlossman, S.F. und Reinherz, E.L. (1983) J. Exp. Med. 158, 988; Antigen-like effects of monoclonal antibodies directed at receptors on human T cell clones.

- Mookerjee, B.K., Azzolina, L. und Poulter, L. (1974) J. Immunol. 112, 822; Interaction of anti-thymocyte serum with hemopoietic stem cells.
- Müller-Eberhard, H.J. und Kunkel, A.G. (1956) J. Exp. Med. 104, 253; The carbohydrate of gamma-globuline and myeloma proteins.
- Müller-Eberhard, H.J. (1984) Springer Semin. Immunopathol. 7, 93; The membrane attack complex.
- Munson, P.J. (1983) Ligand: a computerized analysis of ligand binding data. In: Methods in Enzymologie 92, 543 (Herausgeb.: Langone, J.L. und van Vunakis, H.) Academic Press, New York
- Neuberger M.S. und Rajewski, K. (1981) Eur. J. Immunol. 11, 1012; Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies.
- Norcross, M.A., Smith, R.T. und Shimizu, S. (1984) J. Immunol. 132, 833; Regulation of TCGF production in T cells. II. Early membrane events after anti-Thy-1 binding by TCGF-producing T lymphoma EL-4G-12.
- O'Kunewick, J.P. (1986) Review of effects of anti-T-cell monoclonal antibodies on major and minor GvHR in the mouse. In: Experimental Hematology Today - 1985 (Herausgeb.: Baum, S.J., Pluznik, D.H. und Rosenszajn, L.A.) Spriger Verlag, New York, 133.
- Onaé, K., Fernandes, G. und Good, R.A. (1980) J. Exp. Med. 151, 115; Humoral and cell-mediated immune responses in fully allogeneic bone marrow chimeras in mice.
- Opitz, H.G., Opitz, U., Hewlett, G. und Schlumberger, H.D. (1982) Immunbiol. 160, 438; A new model for investigations of T-cell functions in mice: Differential immunosuppression effects of two monoclonal Thy-1.2 antibodies.
- Ortho Multicenter Transplant Study Group (1985) N. Eng. J. Med. 313, 337; A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants.
- Parkman, R. (1984) Springer Semin. Immunopathol. 7; Preparation for bone marrow transplantation.
- Pearstein, E., Sorvillo, J. und Gigli, J. (1982) J. Immunol. 128, 2036; The interaction of human plasma fibronectin with a subunit of the first component of complement, C1q.

- Pechhumer, H., Wilhelm, M., Rank, G., Kopp, E., Riethmüller, G. und Rieber, E.P. (1984) Immunobiol. 168, 109; Direct monoclonal antibody rosetting - an effective method for weak antigen detection and large scale cell separation.
- Prentice, H.G. et al. (1984) Lancet 1, 472; Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukemic marrow transplant recipients.
- Ralph, P. und Nakoinz, J. (1983) J. Immunol. 131, 1028; Cell-mediated lysis of tumor targets directed by murine monoclonal antibodies of IgM and all IgG isotypes.
- Reif, A.E und Allen, J.M.V. (1964) J. Exp. Med. 120, 413; The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues.
- Reif, A.E. und Allen, J.M. (1966) Nature 209, 521; Mouse thymic iso-antigens.
- Reinherz, E.L., Geha, R., Rapoport, J.M., Wilson, M., Penta, A.C., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Daley, J.F., Levine, H., Rosen, F.S. und Schlossman, S.F. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6047; Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency.
- Rodt, H., Thierfelder, S. und Eulitz, M. (1974) Eur. J. Immunol. 4, 25; Anti-lymphocyte antibodies and marrow transplantation. III. Effects of heterologous antibrain antibodies on acute secondary disease.
- Rodt, H.V. (1979) Habilitationsschrift; Herstellung und Spezifität heterologer Anti-T-Lymphozytenserum und ihre Anwendung im Rahmen der Knochenmarktransplantation und der Leukämiediagnose.
- SAS User's Guide: Statistics Version, 5.Edition (1985); SAS Institute Inc., North Carolina
- Scatchard, G. (1949) Annals of the N. Y. Acad. Sci. 51, 660; The attractions of proteins for small molecules and ions.
- Schreiber, A.D. (1984) Springer Semin Immunopathol. 7, 221; The chemistry and biology of complement receptors.
- Schumaker, V.N., Calcott, M.A., Spielberg, H.L. und Müller-Eberhard, H.J. (1976) Biochemistry 15, 5175; Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of different subclasses to the C1q subunit of the first component of complement.

- Schumaker, V.N., Poon, P.H., Seegan, G.W. und Smith, L.A. (1981) *J. Mol. Biol.* 148, 191; Semiflexible joints in the C1q subunit of the first component of human complement.
- Seaman, W.E., Wofsy, D., Greenspan, J.S. und Ledbetter, J.A. (1983) *J. Immunol.* 130, 1713; Treatment of autoimmune MRC/lpr mice with monoclonal antibody to Thy-1.2: A single injection has sustained effects on lymphoproliferation and renal disease.
- Seto, M., Takahashi, T., Nakamura, S., Matsudaira, Y. und Nishizaka, Y. (1983) *Cancer Res.* 43, 4768; In vivo antitumor effects of monoclonal antibodies with different immunoglobulin classes.
- Siebrecht, M. (1986) Diplomarbeit; Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Rattenantikörper gegen monomorphe Strukturen des Lyt-1 Oberflächenantigens der Maus.
- Sorvillo, J.M., Gigli, J. und Pearlstein, E. (1986) *J. Immunol.* 136, 1023; The effect of fibronectin on the processing of C1q- and C3b/bi-coated immune complexes by peripheral blood monocytes.
- Springer, T., Galfre, G., Secher, D.S. und Milstein, C. (1978) *Eur. J. Immunol.* 8, 539; Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: Identification of noval leucocyte differentiation antigens.
- Springer, T.A., Bhattadarya, A., Cardoza, J.T. und Sandoz-Madrid, F. (1982) *Hybridoma* 1, 257; Monoclonal antibodies specific for IgG1, IgG2a and IgG2b allotypic determinants. Reagents for use with rat monoclonal antibodies.
- Steplewski, Z., Lubeck, M.D. und Koprowski, H. (1983) *Science* 221, 865; Human macrophages armed with murine immunoglobuline G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells.
- Svendson, P.J. (1973) *Scand. J. Immunol. Suppl.* 1, 2, 15; A manual of quantitative immunoelektrophoresis (zitiert von Weeke, B.).
- Taub, R.N. und Lance, E.M. (1968) *Immunol.* 15, 633; Effects of heterologous anti-lymphocyte serum on the distribution of ⁵¹Cr-labelled lymph node cells in mice.
- Tenner, A. und Cooper, N.R. (1980) *J. Immunol.* 125, 1658; Analysis of receptor-mediated C1q binding to human peripheral blood mononuclear cells.

- Tenner, A.J. und Cooper, N.R. (1981) J. Immunol. 126, 1174; Identification of types of cells in human peripheral blood that bind Clq.
- Thierfelder, S. (1977) Nature 269, 691; Haemopoietic stem cells of rats but not of mice express Th-1.1 allo-antigen.
- Thierfelder, S., Hoffmann-Fezer, G., Rodt, H., Doxiadis, J., Eulitz, M. und Kummer, U. (1983) Transplantation 35, 249; Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Absence of immunosuppression in vivo after injection of monoclonal antibodies blocking graft-versus-host reactions and humoral antibody formation in vitro.
- Thierfelder, S., Cobbold, S., Kummer, U., Waldmann, H. und Schuh, R. (1985) Exp. Hematol. 13, 948; Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VII. Two of nine monoclonal anti-Thy-1 antibodies used for pretreatment of donor marrow suppressed graft-versus-host reactions without added complement.
- Thierfelder, S., Kummer, U. Hoffmann-Fezer, G. und Schuh, R. (1986) Blut 52, 255; Combined prophylactic suppression of graft-versus-host and host-versus-graft reactions following treatment of prospective bone marrow recipients with rat IgG2b anti-mouse T cell antibodies.
- Treleuven, J.G., Gibson, F.M., Ugelstad, J., Rembaum, A., Philip, T., Caine, G.D. und Kemshead, J.T. (1984) Lancet 1, 70; Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres.
- Tung, E., Wang, J.Y., Xu, C.S. und Wang, A.C. (1986) Immunol. Invest. 15, 777; Release of Thy-1 from human and murine T-cell lines by specific phospholipase.
- Unkless, J., Fleit, H. und Mellman, J.S. (1981) Adv. Immunol. 31, 247; Structural aspects and heterogeneity of immunoglobulin Fc receptors.
- Vallera, D.A., Soderling, C.C.B., Carlson, G.J. und Kersey, J.H. (1981) Transplantation 31, 218; Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice.
- Vallera, D.A., Soderling, C.C.B. und Kersey, J.H. (1982a) J. Immunol. 128, 871; Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. III. Treatment of donor grafts with monoclonal antibodies directed against Lyt determinants.

- Vallera, D.A., Youle, R.J., Neville, D.M. und Kersey, J.H. (1982b) *J. Exp. Med.* 155, 949; Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers V. Protection of mice from lethal graft-vs.-host disease by pretreatment of donor cells with monoclonal anti-Thy-1.2. coupled to the toxin ricin.
- Volonakis, J.E. und Stroud, R.M. (1972) *J. Immunol. Meth.* 2, 25; Rabbit Clq: purification, functional und structural studies.
- Whitaker, J.R. und Granum, P.E. (1980) *Annual. Biochem.* 109, 156; An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235nm and 280nm.
- Williams, A.F. und Gagnon, J. (1982) *Science*, 216, 696; Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin.
- Zubler, R.H., Lange, G., Lambert, P.H. und Mischer, P.A. (1976) *J. Immunol.* 116, 232; Detection of immune complexes in unheated sera by a modified ^{125}I -Clq binding test.

DANKSAGUNG

Zum Schluß möchte ich mich bei allen Freunden und Kollegen, die durch ihre Hilfe das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben, sehr herzlich bedanken. Dies gilt in besonderer Weise für Herrn Dr. Kummer, der mir die Mitarbeit an einem interessanten Thema ermöglichte und mit unermüdlicher Geduld meine theoretischen und praktischen Kenntnisse formte.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Prof. Thierfelder für den großen Freiraum, den er mir bei der Gestaltung des Themas einräumte, sowie für die Planung der in vivo Versuche.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Antica, Frau Dr. Kremmer, Frau Siebrecht, Herrn PD Dr. Eulitz, Herrn Mysliwietz, Herrn Fürfang und Herrn Lederer für die vielen kritischen Diskussionen und ihre Unterstützung bei vielerlei Problemen.

Für die Durchführung der in vivo Experimente, die ein hohes Maß an Erfahrung voraussetzen, danke ich sehr herzlich Frau Glöckner, Frau Jasny und Frau Meckl, ebenso Frau Jennen für die Einführung in den RIA.

Neben den genannten Personen möchte ich mich bei allen übrigen Mitarbeitern bedanken, die durch ihr Wirken meine Arbeit oft entscheidend erleichtert haben.

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Valet vom MPI in Martinsried für die Anleitung bei der Präparation von Clq, Herrn Dr. Nüssel von der Tierhaltung der GSF, Frau Herbold vom Medis Institut für die statistischen Auswertungen und ganz besonders Herrn Prof. Bandlow für die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät.

LEBENS LAUF

- 2.3.1956 geboren in München als viertes Kind von Dr. Rudolf und Erika Schuh, geb. Leinhas
- 1962-66 Besuch der Volksschule an der Simmernstraße in München
- 1966-75 Besuch des Oskar-von-Miller Gymnasiums in München
- 1975-76 Grundwehrdienst
- 1976-81 Studium der Biologie an der Ludwig Maximilian Universität in München
- 1981 Diplomprüfung in den Fächern Zoologie, Genetik und Biochemie
- 1982-83 Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der LMU München bei Prof. Dr. W. Bandlow über die mitochondriale Genexpression bei Hefe
- 1984-87 Promotion am Institut für Immunologie der GSF München bei Prof. Dr. S. Thierfelder über die Wirkung immunsuppressiver Antikörper

